



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Valéria Alexandra Borges Lopes

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO  
COMPUTACIONAL DE DESENVOLVIMENTO  
DE UM TUMOR GÁSTRICO DIFUSO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica  
com especialização em Instrumentação Biomédica, orientada  
pelos Professores Doutores João Carvalho e Rui Travasso e  
apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências  
e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

julho de 2022



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

---

**Desenvolvimento de um modelo  
computacional de desenvolvimento de um  
tumor gástrico difuso**

---

Valéria Alexandra Borges Lopes

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

*Orientadores:*

Professor Doutor João Carvalho

Professor Doutor Rui Travasso



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Coimbra, julho 2022

Este projeto foi desenvolvido em colaboração com:







Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada

This copy of the thesis has been supplied under the condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores Professor Doutor João Carvalho e Professor Doutor Rui Travasso por toda a disponibilidade, dedicação, apoio, motivação e orientação, não só ao longo da realização deste projeto, mas também ao longo de toda a minha experiência no grupo de investigação.

Agradeço também a todos os membros deste grande grupo, principalmente ao Marcos Gouveia por toda a ajuda que me deu ao longo deste ano e dos restantes. Foi sem dúvida uma grande ajuda.

Um grande obrigado a todos os meus colegas de gabinete, mas principalmente à Ana Fontes e ao Pedro Carriço por toda a amizade, motivação, incentivo e conversas partilhadas ao longo deste ano letivo. Sem eles, o trabalho teria sido muito mais duro.

Quero também agradecer a todos os amigos que me proporcionaram momentos de descontração nos intervalos da realização deste projeto, mas também me incentivaram e motivaram ao longo deste ano.

Um obrigado especial ao Miguel pelo companheirismo e apoio ao longo deste ano e dos restantes. Apesar de longe soube sempre animar-me nos piores momentos e apoiar-me nos melhores.

Por fim, deixo o meu maior agradecimento à minha família, aos meus pais e aos meus avós, o meu maior apoio nos bons e maus momentos, o meu suporte em todas as situações. Agradeço-lhes por todo esforço e dedicação ao longo do meu percurso, certamente não foi em vão!

Obrigada a todos, os mencionados e não mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que a realização deste projeto corresse da melhor maneira e para que no fim, me sentisse orgulhosa pelo trabalho desenvolvido.

Obrigada!



# Abstract

Gastric cancer is the fifth most common pathology in the world and considered the third leading cause of cancer related death in both sexes. Hereditary diffuse gastric cancer (CGDH) is a diffuse type of gastric cancer originating from genetic mutations, mainly in the CDH1 and CTNNA1 genes, both involved in cell adhesion, so that CGDH is characterized by tumor cells with poor adhesion to other cells, resulting in a population of non-cohesive, scattered, approximately circular, signet ring-shaped cells.

Due to their specific characteristics, early diagnosis of this type of pathology is very difficult, and the main form of treatment is total gastrectomy, which has a major impact on the patients' lives.

To fill these serious gaps in the understanding of the progress of CGDH, its diagnosis and treatment, a computational model based on the cellular Potts model (CPM) was developed, allowing the mimicking of the characteristic invagination structure that constitutes the gastric epithelium, where this type of cancer spreads. The simulations allowed to study the influence of tumor cell adhesion to the extracellular matrix and to other cells, the influence of cell rigidity on tumor propagation, and the relationship between tumor development and cell cycle length. The shape of the tumor cells was also evaluated in comparison to the typical signet ring cells that characterize CGDH and the relationship between tumor development and neighboring structures, namely other invaginations that form the gastric epithelium. These studies allowed us to conclude that the model developed is simple but realistic, since the results obtained agree with the literature, but also with histological sections of this type of cancer. The results presented also allowed us to propose some possible adjuvant therapies, namely the ones that increase cell adhesion, but also the decrease of cell cycle time.

**Keywords:** gastric cancer, hereditary diffuse gastric cancer, cellular Potts model, cell adhesion, novel therapies.



# Resumo

O cancro gástrico é a quinta patologia mais comum no mundo, e considerada a terceira causa de morte por cancro em ambos os sexos. O cancro gástrico difuso hereditário (CGDH) é um tipo de cancro gástrico do tipo difuso com origem em mutações genéticas, principalmente nos genes CDH1 e CTNNA1, ambos envolvidos na adesão celular, pelo que o CGDH se caracteriza por células tumorais com fraca adesão às demais, o que resulta numa população de células não coesas, dispersas e com forma em anel de sinete, aproximadamente circulares.

Devido às suas características específicas o diagnóstico precoce deste tipo de patologias é muito difícil, sendo a principal forma de tratamento a gastrectomia total, o que se traduz num grande impacto na vida dos doentes.

Por forma a colmatar estas falhas graves no entendimento do progresso do CGDH, do seu diagnóstico e tratamento, foi desenvolvido um modelo computacional baseado no modelo *cellular Potts* (CPM) que permite mimetizar a estrutura de uma invaginação que constitui o epitélio gástrico, onde se propaga este tipo de cancro. As simulações realizadas permitiram estudar a influência da adesão das células tumorais à matriz extra-celular e às restantes, a influência da rigidez das células na propagação do tumor e ainda a relação entre o desenvolvimento tumoral e a duração do ciclo celular. Foi também avaliada a forma das células tumorais comparativamente às típicas células em anel de sinete que caracterizam o CGDH e a relação entre o desenvolvimento tumoral e as estruturas vizinhas, nomeadamente outras invaginações que formam o epitélio gástrico. Estes estudos permitiram concluir que o modelo desenvolvido é simples, mas realista, visto que os resultados obtidos vão de encontro ao exposto na literatura, mas também aos cortes histológicos deste tipo de cancro. Os resultados apresentados permitiram ainda propor algumas possíveis terapias coadjuvantes, nomeadamente o aumento da adesão celular, mas também a diminuição da duração do ciclo celular.

**Palavras-chave:** cancro gástrico, cancro gástrico difuso hereditário, modelo celular Potts, adesão celular, novas terapias.





# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivos . . . . .	1
1.2	Motivação . . . . .	1
1.3	Estado da arte . . . . .	2
1.4	Estrutura da tese . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Contexto biológico</b>	<b>5</b>
2.1	Estômago . . . . .	5
2.2	Cancro gástrico . . . . .	10
2.3	Cancro gástrico difuso hereditário . . . . .	14
2.3.1	Origem . . . . .	15
2.3.2	Diagnóstico e monitorização . . . . .	18
2.3.3	Tratamento . . . . .	19
2.3.4	Outras patologias associadas ao CGDH . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Métodos</b>	<b>23</b>
3.1	<i>Cellular Potts Model</i> (CPM) . . . . .	23
3.1.1	Hamiltoniano . . . . .	25
3.1.2	Algoritmo Metropolis-Hastings (AMH) . . . . .	27
3.1.3	Etapas do CPM . . . . .	30
3.2	<i>Connected Component Analysis</i> (CCA) . . . . .	33
3.3	Modelo desenvolvido . . . . .	35
3.3.1	Homeostasia . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>39</b>
4.1	Condições iniciais . . . . .	39

4.2	Células tumorais . . . . .	42
4.3	Avaliação do volume das células . . . . .	44
4.4	Influência da adesão das células . . . . .	47
4.4.1	Influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular na distância de extrusão . . . . .	47
4.4.2	Influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular no volume da célula tumoral . . . . .	50
4.4.3	Influência da adesão entre a célula tumoral e as restantes células na distância de extrusão . . . . .	51
4.4.4	Influência da adesão entre a célula tumoral e as restantes células no volume da célula tumoral . . . . .	54
4.5	Influência da rigidez das células tumorais . . . . .	56
4.5.1	Influência da rigidez das células tumorais na sua distância de extrusão . . . . .	56
4.5.2	Influência da rigidez das células tumorais no volume das mesmas . . . . .	58
4.6	Proliferação tumoral . . . . .	60
4.6.1	Influência da duração do ciclo celular . . . . .	62
4.6.2	Forma das células tumorais . . . . .	63
4.6.3	Influência do crescimento do tumor nas estruturas envolventes . . . . .	67
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>69</b>
5.1	Trabalho futuro . . . . .	71

# Lista de Figuras

2.1	Sistema digestivo e localização do estômago. . . . .	6
2.2	Regiões anatômicas do estômago e respetiva estrutura do epitélio gástrico. . . . .	7
2.3	Representação esquemática das invaginações, das suas diferentes regiões e das respetivas células que as constituem, na região do antro e do corpo. . . . .	9
2.4	Classificação de Borrmann. . . . .	10
2.5	Classificação histológica de Laurén, em tipo intestinal, difuso e misto. . . . .	11
2.6	Representação da evolução dos diferentes estadios do cancro gástrico. . . . .	14
2.7	Representação da ação da E-caderina, da sua ligação às caderinas e da expressão de genes. . . . .	17
2.8	Representação do procedimento de uma endoscopia digestiva alta usada como meio de diagnóstico do cancro gástrico. . . . .	19
2.9	Nodos linfáticos próximos que, por norma, são removidos aquando das gastrectomias profiláticas. . . . .	20
3.1	Esquema representativo da base do CPM. . . . .	24
3.2	Vizinhança de von Neumann tridimensional. . . . .	26
3.3	Diagrama de fluxo que representa cada iteração que constitui os passos de Monte Carlo. . . . .	32
3.4	Esquema representativo das células do CPM e de uma tentativa de cópia de um elemento. . . . .	33
3.5	Avaliação da conectividade de uma célula. . . . .	34
3.6	Algoritmo CCA. . . . .	35
4.1	Evolução do modelo ao longo do tempo com as condições iniciais aplicadas. . . . .	41
4.2	Modelo tridimensional e respetivos cortes longitudinal e transversal no início da simulação. . . . .	41

4.3	Comparação entre um corte histológico e um corte longitudinal do modelo desenvolvido. . . . .	42
4.4	Evolução do modelo com a presença de uma célula tumoral. . . . .	43
4.5	Evolução da distância de extrusão da célula tumoral ao longo da simulação. . . . .	44
4.6	Volume médio das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais) ao fim de 500 PMC em função de diferentes valores de $\lambda^V$ . . . . .	45
4.7	Evolução do volume das células ao longo da simulação. . . . .	46
4.8	Evolução do volume da célula tumoral ao longo da simulação. . . . .	46
4.9	Variação da distância de extrusão ao longo do tempo. . . . .	48
4.10	Relação entre a distância de extrusão da célula tumoral e a adesão da mesma à matriz extra-celular ao fim de 500 PMC. . . . .	48
4.11	Representação de cortes transversais do modelo, para diferentes valores de $J$ entre a célula tumoral ( $T$ ) e a matriz extra-celular ( $M$ ). . . . .	49
4.12	Relação entre a adesão da célula tumoral à matriz extra-celular representada pelo valor de $J_{TM}$ e o volume da célula tumoral ao fim de 500 PMC. . . . .	50
4.13	Relação entre a adesão da célula tumoral à matriz extra-celular e o volume das células estaminais, progenitoras, mucosas e parietais no fim de 500 PMC. . . . .	51
4.14	Relação entre a distância de extrusão da célula tumoral e a adesão da mesma às restantes células que a envolvem ( $J_{TC}$ ) ao fim de 500 PMC. . . . .	52
4.15	Variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os diferentes valores de $J$ entre a célula tumoral ( $T$ ) e as restantes células ( $C$ ). . . . .	53
4.16	Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço no final da simulação, para diferentes valores de $J$ entre a célula tumoral ( $T$ ) e as restantes células ( $C$ ). . . . .	54
4.17	Relação entre o volume da célula tumoral e a adesão da mesma às restantes células que a envolvem ( $J_{TC}$ ) ao fim de 500 PMC. . . . .	55
4.18	Relação entre a rigidez da célula tumoral ( $\lambda^V(CT)$ ) e a sua distância de extrusão ao fim de 500 PMC. . . . .	56
4.19	Variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os diferentes valores de $\lambda^V$ da célula tumoral ( $CT$ ) ao fim de 500 PMC. . . . .	57
4.20	Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço no final da simulação, para diferentes valores de $\lambda^V$ da célula tumoral $\lambda^V(CT)$ . . . . .	58
4.21	Relação entre o valor de $\lambda^V$ da célula tumoral ( $\lambda^V(CT)$ ) e o seu respetivo volume. . . . .	59

4.22	Relação entre o valor de $\lambda^V$ da célula tumoral ( <i>CT</i> ) e o volume das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais). . . . .	60
4.23	Evolução da proliferação tumoral ao longo do tempo. . . . .	61
4.24	Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço ao longo do tempo. . . . .	62
4.25	Volume do tumor com diferente duração do ciclo celular. . . . .	62
4.26	Representação de cortes transversais do modelo para diferentes valores de duração do ciclo celular. . . . .	63
4.27	Imagem histológica do epitélio do estômago e das estruturas em anel de sinetotípicas do CGDH. . . . .	64
4.28	Representação do modelo com proliferação tumoral controlada e cortes transversais de várias regiões do tumor. . . . .	64
4.29	Razão entre o momento de inércia médio das células tumorais e o momento de inércia de uma esfera com a mesma massa. . . . .	66
4.30	Cortes transversais de uma invaginação na região superior do pescoço ao longo da simulação. . . . .	67
4.31	Representação de duas invaginações, uma com uma célula tumoral a proliferar em direção à outra. . . . .	68
4.32	Cortes transversais do modelo considerando duas invaginações e uma célula tumoral com proliferação. . . . .	68



# Lista de Tabelas

2.1	Nomenclatura TNM. . . . .	13
2.2	Crêterios genéticos de identifica�o de cancro gástrico difuso hereditário. . . . .	18
3.1	Tipo de células usadas no modelo. . . . .	36
4.1	Valores iniciais dos parâmetros do CPM. . . . .	40
4.2	Valores de adesão tumor-células ( $J$ ). . . . .	40
4.3	Valores iniciais dos parâmetros usados no Hamiltoniano. . . . .	40





# Lista de Abreviaturas

**INE** Instituto Nacional de Estatística

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**AJCC** *American Joint Committee on Cancer*

**UICC** *International Union Against Cancer*

**CGD** cancro gástrico difuso

**CGDH** cancro gástrico difuso hereditário

**CMLI** cancro da mama lobular invasivo

**HER2** *Human epitelial growth factor receptor 2*

**IGCLC** *International Gastric Cancer Linkage Consortium*

**CML** cancro da mama lobular

**CLIS** carcinoma lobular *in situ*

**CPM** *Cellular Potts Model*

**AMH** Algoritmo Metropolis-Hastings

**MCMC** algoritmos de Monte Carlo associados às cadeias de Markov

**PMC** passos de Monte Carlo

**MEC** Matriz Extra-Celular

**CCA** *Connected Component Analysis*

# Capítulo 1

## Introdução

No presente capítulo são apresentados os objetivos do projeto (Secção 1.1), a motivação para o desenvolver onde se englobam alguns dados estatísticos (Secção 1.2), o estado da arte (Secção 1.3) e, por último, é descrita a estrutura da dissertação (Secção 1.4).

### 1.1 Objetivos

O projeto descrito nesta dissertação de mestrado tem como objetivo a criação de um modelo computacional que descreva o desenvolvimento do cancro gástrico difuso hereditário, permitindo estudar o crescimento tumoral, auxiliando no diagnóstico e no estudo de possíveis terapias.

### 1.2 Motivação

O cancro gástrico é a quinta patologia mais comum no mundo, é considerada a terceira causa de morte por cancro em ambos os sexos, ficando apenas atrás do cancro do pulmão, em primeiro, e do cancro colo-retal, em segundo [1]. Todos os anos aproximadamente 1 000 000 de pessoas são diagnosticadas com cancro gástrico e 800 000 acabam mesmo por morrer. No entanto, apesar da taxa de mortalidade deste tipo de cancro ter vindo a diminuir ao longo dos últimos 10 anos, a taxa de sobrevivência mantém-se baixa [2].

Em Portugal, de acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2019 (último ano com dados registados), o cancro gástrico foi o terceiro tipo de cancro com maior mortalidade (2246 mortes num universo de 28 464), só atrás de tumores do cólon, reto e ânus, e da traqueia, brônquios e pulmão, mantendo uma maior incidência em indivíduos do sexo masculino [3].

Por conseguinte, é preponderante perceber o que está na base deste tipo de cancro, bem como

quais as possíveis formas de tratamento, que possam ser inovadoras e que ajudem a melhorar a qualidade de vida dos doentes. Para isso, os modelos computacionais são fulcrais, uma vez que reduzem o uso de modelos animais na busca de novas soluções, sendo mais fácil testar diferentes terapias, já que este tipo de modelos visam mimetizar o comportamento biológico, no caso, do cancro gástrico difuso hereditário.

### 1.3 Estado da arte

O cancro é a segunda causa de morte a nível mundial. Em 2018 matava uma em cada seis pessoas diagnosticadas [4]. A taxa de sobrevivência para vários tipos de cancro aumenta consideravelmente quando a deteção é feita precocemente, contudo é necessário perceber os mecanismos na origem da evolução tumoral, bem como o seu comportamento perante algumas terapias passíveis de serem aplicadas. Para isso, os modelos matemáticos e computacionais são fundamentais, uma vez que permitem perceber como evolui um tumor com características específicas.

Vários são os modelos computacionais desenvolvidos para estudar o crescimento tumoral, uns mais complexos que outros. Alarcón *et al.* (2003-2006) [5–7] desenvolveram um modelo simples usando autómatos celulares e equações diferenciais para simular o desenvolvimento tumoral, considerando o fluxo sanguíneo, o transporte de oxigénio e de nutrientes, e as interações celulares. Mais tarde, Owen *et al.* (2009) [8] usaram o mesmo modelo, tornando-o mais realista, implementando a angiogénese. Poplawski *et al.* (2009) [9] desenvolveram um modelo computacional usando o CPM, tendo em conta o trabalho de Anderson *et al.* (2005) [10]. Neste modelo era simulada a vasculatura tumoral, acrescentando ainda os efeitos de adesão e transporte de nutrientes na sua morfologia. No mesmo ano, Shirinifard *et al.* (2009) [11] criaram um modelo computacional usando o *Cellular Potts Model* que descrevia tridimensionalmente o desenvolvimento tumoral, bem como a sua vasculatura, de uma forma simplificada. Recentemente, Jeanquartier *et al.* (2016) [12] usaram uma interface web para a visualização do crescimento tumoral usando o CPM para a implementação do comportamento celular. Todos estes modelos descritos utilizam modelos computacionais, mais ou menos complexos, para simular o comportamento celular e, assim, analisar o crescimento tumoral e a sua vasculatura. No entanto, estes modelos focam-se principalmente na influência dos vasos sanguíneos, da angiogénese e do transporte de oxigénio e nutrientes no desenvolvimento tumoral.

Carvalho *et al.* (2020, 2021) [13, 14] desenvolveram um modelo computacional, primeiro

em 2D (2020) e mais tarde em 3D (2021), usando o CPM para estudar o comportamento do cancro da bexiga, desde o seu estadio inicial, até aos estadios invasivos. Este trabalho focou-se principalmente nas condições físicas e mecânicas em que o tumor se desenvolve, não considerando a angiogénese, nem o transporte de nutrientes e oxigénio; foram ainda consideradas algumas terapias aplicadas a este tipo de cancro, nomeadamente a ablação tumoral ou a quimioterapia. O modelo desenvolvido e descrito nesta dissertação foi adaptado a partir do modelo criado por Carvalho *et al.* (2021) [14], mas desta vez aplicado ao cancro gástrico difuso hereditário.

No que diz respeito ao cancro gástrico, os principais modelos computacionais criados têm por base *Machine Learning* e são usados para prever anomalias histopatológicas características deste tipo de cancro em imagens de tomografia computadorizada, como é o caso do modelo criado por Li *et al.* (2019) [15].

### 1.4 Estrutura da tese

Esta dissertação contém cinco capítulos. O Capítulo 1 corresponde à Introdução onde são descritos os objetivos do projeto, bem como a motivação, o estado da arte e a estrutura da dissertação. No Capítulo 2 é feita referência ao contexto biológico do projeto, começando do genérico para o particular: identificação do órgão em estudo, o estômago, descrição e referência de algumas das suas características. Posteriormente é descrito de forma breve em que consiste o cancro gástrico e quais as suas características e, por último, é definido o cancro gástrico difuso hereditário e identificadas as suas características histológicas e anatómicas, fazendo referência à origem, diagnóstico e tratamento. No Capítulo 3 são descritos os métodos usados na criação do modelo computacional em causa. No Capítulo 4 são apresentados os resultados, bem como alguns comentários e discussões. Por último, no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões do projeto, assim como possíveis terapias e o trabalho futuro.



## Capítulo 2

# Contexto biológico

No presente capítulo serão apresentados os conceitos biológicos que estão na base do projeto desenvolvido, evoluindo a partir de conceitos genéricos até ao tema central do projeto. Desta forma, na Secção 2.1 é apresentado de forma breve o órgão em estudo, o estômago, as suas divisões anatómicas e histológicas, as suas funções e patologias associadas. Na Secção 2.2 são descritas as principais classificações patológicas utilizadas na avaliação do desenvolvimento do cancro gástrico. Por último, na Secção 2.3 é introduzido o tema do CGDH, identificando a sua origem, meios de diagnóstico e monitorização, tratamento e ainda outras patologias associadas.

### 2.1 Estômago

O estômago é um órgão em forma de J, pertencente ao sistema digestivo. Localiza-se na parte superior do abdómen, ligeiramente deslocado para a esquerda, entre o esófago e o intestino, imediatamente abaixo do diafragma (Figura 2.1) [16,17]. Apresenta uma região côncava do lado direito, designada de pequena curvatura, e uma convexa do lado esquerdo, apelidada de grande curvatura.

Quando o estômago está vazio, o epitélio que o reveste forma numerosas dobras longitudinais semelhantes a dedos conhecidas por invaginações, que desaparecem quando o estômago está distendido, o que acontece durante o processo de digestão.

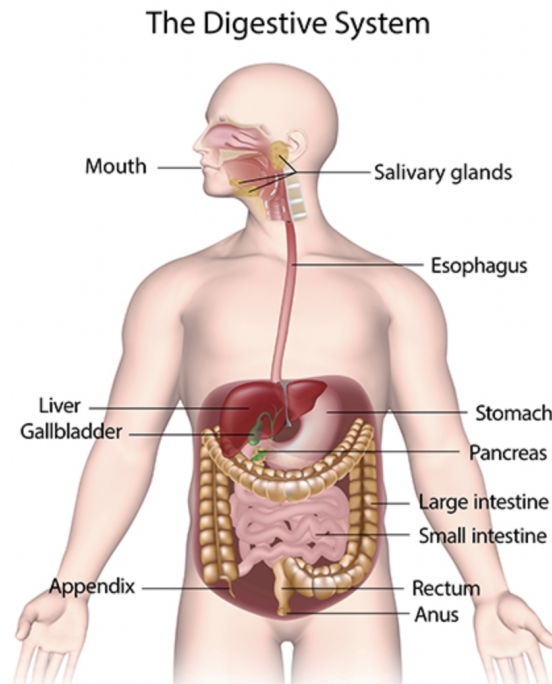


Figura 2.1: Sistema digestivo e localização do estômago.  
Imagem de domínio público em [16].

Os alimentos ingeridos e previamente triturados passam pelo esôfago até ao estômago, onde são armazenados e misturados com o suco gástrico produzido pelas glândulas gástricas, localizadas na base das invaginações que revestem o estômago. Forma-se, então, o quimo que passa para o intestino através do duodeno, que funciona como passagem entre o estômago e o intestino. Em ambas as aberturas do estômago, ligadas ao esôfago e ao duodeno, há esfíncteres que evitam o refluxo. Estes são formados por músculos de fibras circulares concêntricas dispostas em forma de anel. Os esfíncteres do estômago são formados pela continuação da camada muscular que constitui a sua parede. O esfíncter cárdico localiza-se entre o esôfago e o estômago e impede que os alimentos regressem ao esôfago, após a sua passagem para o estômago. O esfíncter pilórico localiza-se na parte final do estômago, na passagem para o duodeno, impedindo que o quimo regresse ao estômago após passar para o duodeno. Desta forma, a principal função do estômago é armazenar temporariamente os alimentos ingeridos, misturá-los e quebrá-los graças à ação do movimento dos músculos da sua parede e às secreções ácidas libertadas. Apesar da absorção dos nutrientes ocorrer ao longo de todo o tubo digestivo, o estômago não apresenta um papel considerável nesse aspeto, pelo contrário, é apenas responsável pela absorção de água, álcool e algumas drogas.

Anatomicamente, o estômago divide-se em cinco regiões (ver Figura 2.2) [17, 18]:



- **Cardia** – primeira parte do estômago, logo após o esôfago. É onde se localiza o esfíncter cárdico.
- **Fundo** - região superior do estômago. Adapta-se às variações de volume durante o processo de digestão.
- **Corpo** - região mais larga onde os alimentos ingeridos são armazenados, misturados e onde se inicia a sua quebra.
- **Antro** - região inferior do estômago, com forma semelhante a um funil, cuja extremidade mais larga se une à parte inferior do corpo e a sua extremidade mais pequena ao piloro. É nesta região que o alimento previamente quebrado no corpo é armazenado até ser libertado no intestino delgado.
- **Piloro** - região do estômago que faz a ligação ao intestino delgado, nomeadamente ao duodeno. É onde se localiza o esfíncter pilórico.

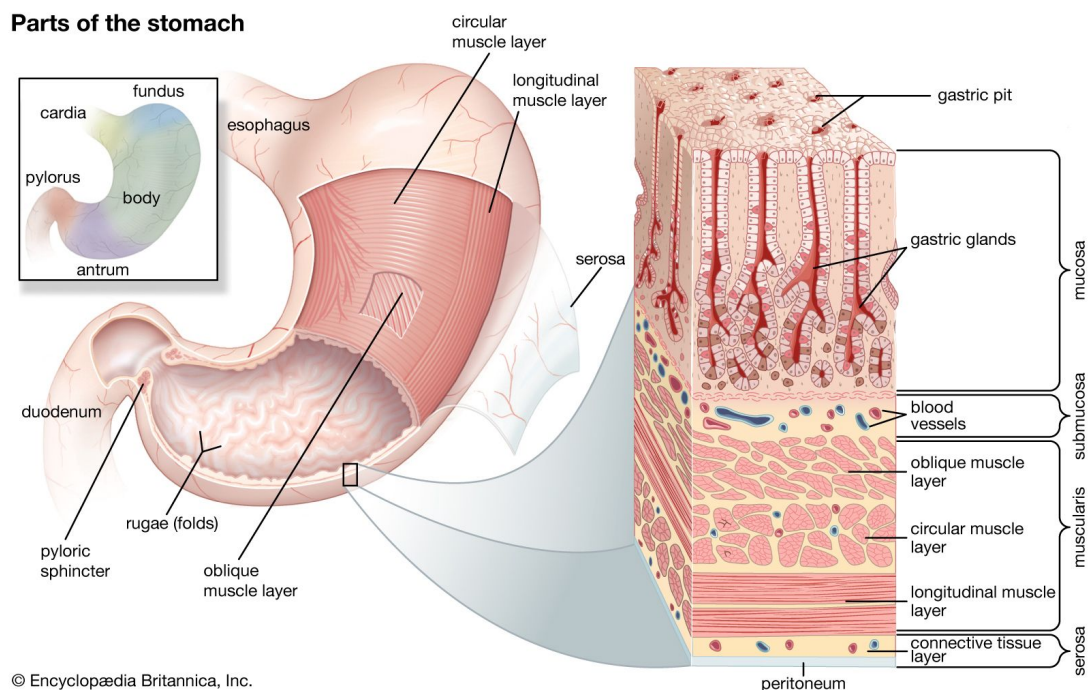


Figura 2.2: Regiões anatómicas do estômago e respetiva estrutura do epitélio gástrico. Imagem de domínio público em [18].

As paredes do estômago são formadas por quatro camadas de tecido (ver Figura 2.2) [18]:

- **Mucosa** - camada que reveste a parte interna do estômago. Quando este está vazio, esta camada apresenta um aspeto rugoso, que tende a desaparecer durante o processo digestivo.

- **Submucosa** - camada que recobre a mucosa, formada por tecido conectivo que contém vasos sanguíneos e linfáticos, células e fibras nervosas.
- ***Muscularis propria* ou *muscularis externa*** - camada que reveste a submucosa. Consiste no músculo gástrico, formado por três camadas de músculo com características distintas, que serão descritas mais à frente.
- **Serosa** - membrana fibrosa que recobre a região externa do estômago, também conhecida como peritoneu visceral.

Como já mencionado, a *muscularis externa* é constituída por três camadas de músculo com características distintas (ver Figura 2.2) [18]:

- **Músculo longitudinal** - camada muscular mais externa, formada por fibras musculares longitudinais, à semelhança do esófago, é, portanto, uma continuação do músculo que constitui as paredes do esófago. Este tipo de músculo continua até ao duodeno e intestino delgado.
- **Músculo circular** - camada muscular intermédia, sendo a que apresenta maior robustez.
- **Músculo oblíquo** - camada muscular mais interna, formada por músculo liso, sendo mais forte na região do fundo e progressivamente mais fraca na região do piloro.

A mucosa é revestida por um epitélio simples colunar, com numerosas estruturas em forma de dedo, designadas de invaginações, que se prolongam até à lamina própria. Estas são formadas geralmente por três regiões: fosso, istmo e base, sendo que na base localizam-se as glândulas gástricas. Porém, dependendo da região anatómica do estômago, pode ainda existir uma região intermédia entre o istmo e a base, designada por pescoço. O tipo de células existente em cada região depende do local do estômago considerado. Por exemplo, as invaginações do antro dividem-se apenas em três regiões, o fosso, o istmo e a base, não possuindo em nenhuma destas células parietais. No entanto, as invaginações do corpo dividem-se em fosso, istmo, pescoço e base, sendo que no pescoço estão presentes células parietais (ver Figura 2.3). De um modo geral, há cinco tipos de células diferenciadas nas invaginações: células mucosas superficiais, células mucosas do pescoço, células parietais, células principais, enteroendocrinas (que incluem células G <sup>1</sup>, D <sup>2</sup> e ECL <sup>3</sup>) e as designadas células tufo que constituem as glândulas gástricas.

<sup>1</sup>As células G são responsáveis por segregar gastrina [19].

<sup>2</sup>As células D produzem e segregam somatostatina [20].

<sup>3</sup>As células ECL sintetizam e segregam histamina em resposta à estimulação da gastrina. Em conjunto potenciam a secreção de ácido pelas células parietais [21].

Na Figura 2.3 encontra-se a representação das invaginações bem como as diferentes regiões que as compõe e as respectivas células. É também possível comparar os diagramas com imagens histológicas do antro e do corpo, as duas regiões do estômago representadas.

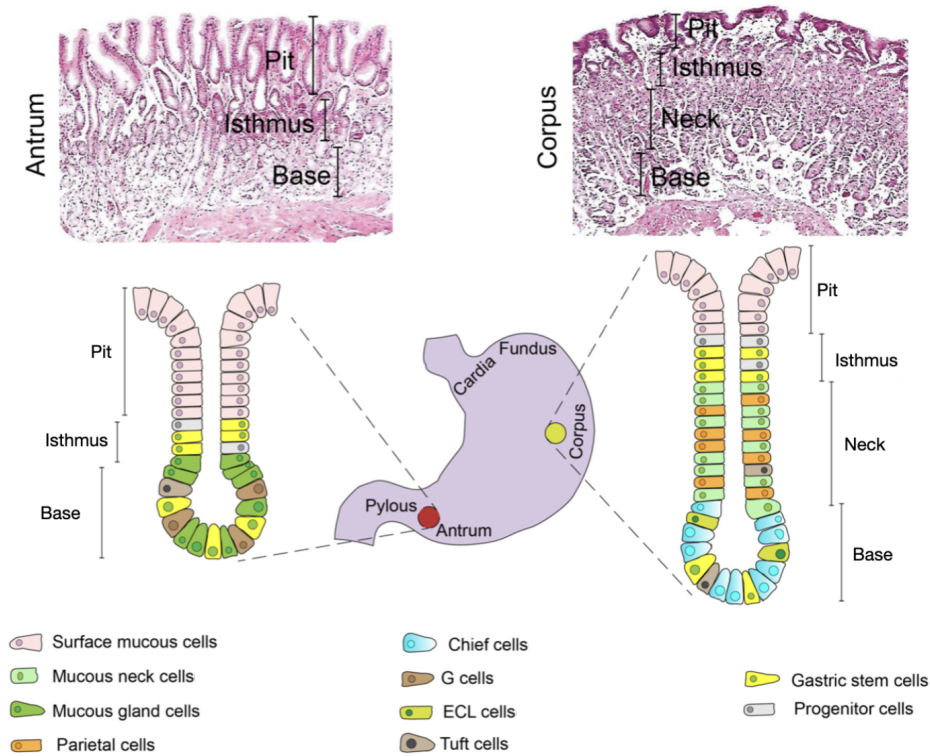


Figura 2.3: Representação esquemática das invaginações, das suas diferentes regiões e das células respetivas que as constituem, na região do antro e do corpo. Estão também representadas as imagens histológicas das diferentes partes que formam as invaginações do antro e do corpo.

Imagem adaptada de [22].

Devido às condições fisiológicas a que as células do epitélio gástrico estão sujeitas, nomeadamente devido às secreções ácidas envolvidas no processo de digestão, o epitélio renova-se a cada três dias, por forma a manter a sua integridade. Isto só é possível graças à ação das células estaminais do epitélio [22].

Como já referido anteriormente, o estômago é responsável por armazenar os alimentos, misturá-los e quebrá-los, porém desempenha também um importante papel no que concerne à defesa do organismo, nomeadamente contra micróbios provenientes dos alimentos. É por isso, afetado por algumas patologias, como gastrites, úlceras pépticas, infeções por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e cancro gástrico. As gastrites consistem em inflamações da mucosa gástrica, sendo mais frequentes do que as infeções por *H.pylori*. A inflamação crónica da mucosa gástrica conduz à perda progressiva de glândulas gástricas, atrofia, ou à sua substituição por células mutadas, metaplasias. Ambos os casos são reconhecidos como precursores de carcinogénese gástrica, tema

abordado na secção seguinte.

## 2.2 Cancro gástrico

Existem numerosas classificações patológicas que avaliam o desenvolvimento do cancro gástrico, tendo em conta os seus aspetos macro e microscópicos. Todos são comumente usados, mas nenhum deles foi ainda aceite como sistema padrão.

A primeira classificação foi proposta por Borrmann em 1926 [23] e baseia-se na aparência macroscópica do tumor. De acordo com esta os tumores são classificados em quatro tipos: tipo I (polipóide), tipo II (fúngica), tipo III (ulcerada) e tipo IV (plana ou difusa infiltrativa) [24]. Na Figura 2.4 encontra-se uma representação esquemática da forma destes quatro tipos na classificação de Borrmann.

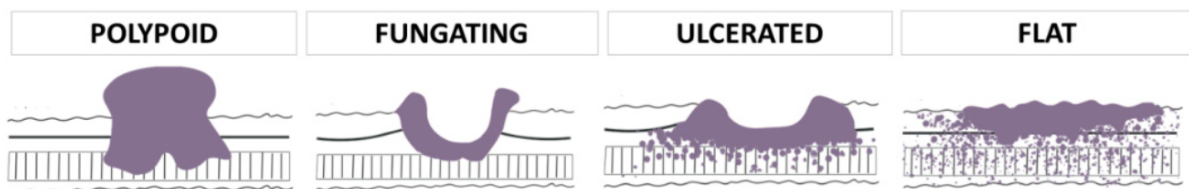


Figura 2.4: Classificação de Borrmann.

Imagem adaptada de [24].

De acordo com a investigação levada a cabo por Díaz del Arco *et al.* (2021) [24], os tumores planos são diagnosticados em doentes mais novos, com uma média de idades de 62 anos, ao contrário do que acontece com os tumores polipóides, ulcerados (70-71 anos) ou fúngicos (77 anos). Os tumores ulcerados apresentam ainda dimensões mais reduzidas (tamanho médio de 30mm), contrariamente aos tumores polipóides, fúngicos e planos (48 – 53mm). Comparando com a classificação de Laurén, abordada mais à frente na presente secção, 67-73% dos tumores do tipo polipóide e fúngico e 49% dos tumores ulcerados são do tipo intestinal, sendo que os tumores do tipo plano são frequentemente difusos (67%). Células em anel de sinete estão associadas aos tumores do tipo plano em 62,5% dos casos e ao tipo ulcerado em 43,6% [24].

Mais tarde, em 1965, Pekka Laurén [2] propôs uma outra classificação do cancro gástrico, desta vez clinico-histológica, dividindo-o em dois tipos principais: o tipo intestinal e o tipo difuso, exibindo diferentes patologias, epidemiologias e etiologias [25]. No entanto, mais tarde verificou-se que determinados indivíduos agregam os dois tipos, acrescentando-se, por isso, uma outra nomenclatura à classificação de Laurén, o tipo misto [2]. As imagens histológicas destes três tipos de cancro gástrico estão representadas na Figura 2.5.

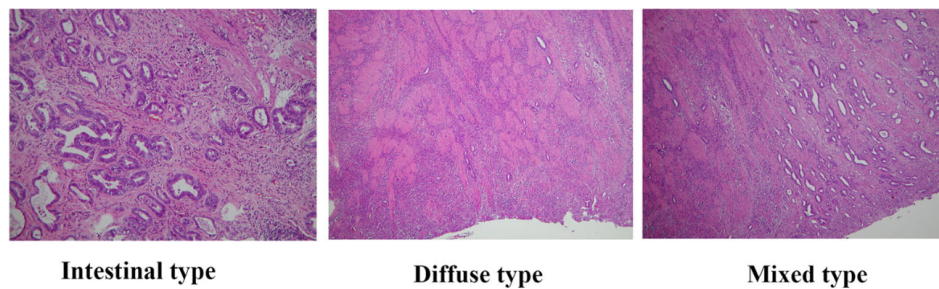


Figura 2.5: Classificação histológica de Laurén, em tipo intestinal, difuso e misto. Imagem adaptada de [2].

Nos tumores do tipo intestinal, as células tumorais apresentam uma maior adesão, organizando-se em formações tubulares ou glandulares, estando, geralmente, associado a metaplasias intestinais com invasão vascular e linfática, o que promove a dispersão do tumor para outras partes do corpo [25]. Este tipo de cancro surge maioritariamente em indivíduos do sexo masculino com uma idade mais avançada, afetando principalmente a região do antro no estômago; no entanto, apresenta um melhor prognóstico [2]. Contrariamente, no cancro gástrico do tipo difuso as células tumorais apresentam uma perda de adesão às demais, o que resulta numa maior invasão do estroma por uma única célula, ou por grupos pequenos de células, levando a uma população de células tumorais não coesas e dispersas. O cancro gástrico difuso tem uma maior incidência nos indivíduos de sexo masculino com idades inferiores a 65 anos. Comparativamente com o cancro gástrico do tipo intestinal, o tipo difuso apresenta maiores dimensões, entre 4 e 8cm, desenvolve-se maioritariamente na região central do estômago (corpo) e as células apresentam pouca diferenciação. Em termos de invasão, o tipo difuso tem uma maior invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos, estendendo-se predominante em direção à lâmina própria; em contrapartida, no tipo intestinal a invasão ocorre maioritariamente para a região da mucosa [2].

Na gênese destes tipos de cancro gástrico está a metilação do DNA, modificações de histonas e recombinação cromossômica. Todavia, ambos partilham fatores de risco como a dieta e o ambiente envolvente, sendo este último um dos fatores predominantes no tipo intestinal. O cancro gástrico do tipo difuso pode ter na sua origem causas genéticas, como discutido mais à frente na presente dissertação.

Na Secção 2.1 foi mencionado que a infeção por *H. pylori* pode estar na origem do cancro gástrico, o que associado a fatores ambientais e alimentares, pode despoletar cancro gástrico do tipo intestinal. No que concerne ao cancro gástrico do tipo difuso, este surge, normalmente, associado a gastrites.

Por fim, mais recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação

mais detalhada comparativamente às anteriores. Assim, de acordo com a OMS, há cinco tipos de cancro gástrico: adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma pouco coesivo, e carcinoma misto. Os adenocarcinomas tubulares são compostos por pequenos tubos ramificados, designados por túbulos, de diferentes tamanhos, cujo diâmetro varia. Neste tipo de tumores as células tumorais individuais são colunares, cuboídes ou achatadas, podem ainda ser pouco diferenciadas, sendo que nesse caso, os tumores designam-se carcinomas sólidos. Já no caso de possuírem um estroma linfoide proeminente designam-se carcinomas medulares ou carcinomas com estroma linfoide [26]. No caso dos adenocarcinomas papilares, estes desenvolvem-se na direção para fora da parede do estômago, originando estruturas em forma de dedo que se projetam para o interior da cavidade do estômago. Por norma as células tendem a comportar-se como células normais. Os adenocarcinomas mucinosos apresentam uma grande quantidade de mucinas (principal substância constituinte do muco) fora das células cancerígenas. Os carcinomas pouco coesivos incluem os carcinomas formados por células em anel de sinete e organizados em aglomerados de células tumorais. Por último, o carcinoma misto possui uma mistura de vários tipos de adenocarcinomas [26].

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e a *International Union Against Cancer* (UICC) criaram um sistema que descreve o estadio e disseminação do cancro no corpo do doente, usando a nomenclatura TNM (ver Tabela 2.1). T descreve o tamanho e a disseminação do tumor no tecido próximo; N descreve a disseminação do cancro para os nodos linfáticos próximos; e M descreve a existência de metástases (disseminação do cancro para outras partes do corpo) [27].

Tabela 2.1: Nomenclatura TNM. Adaptada de [27].

Estadio	Tumor (T)	Nodos Linfáticos (N)	Metástases (M)
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
	T1	N1	
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	
	T1	N2	
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	
	T2	N2	
	T1	N3a	
Estadio IIIA	T4b	N0	M0
	T4a	N1	
	T4a	N2	
	T3	N2	
	T2	N3a	
Estadio IIIB	T4b	N1 or N2	M0
	T4a	N3a	
	T3	N3a	
	T2	N3b	
	T1	N3b	
Estadio IIIC	T4b	N3a or N3b	M0
	T4a	N3b	
	T3	N3b	
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Tis** – Tumor *in situ*; **T1** – o tumor invade a lamina própria ou a submucosa; **T2** – o tumor invade a muscularis própria ou a subserosa; **T3** – o tumor invade o tecido conectivo da subserosa sem invadir a serosa (peritoneu visceral) ou as estruturas adjacentes; **T4a** – o tumor invade a serosa; **T4b** – o tumor invade as estruturas adjacentes à serosa; **N0** – não há invasão dos nodos linfáticos próximos; **N1** – invasão de um a dois nodos linfáticos; **N2** – invasão de três a seis nodos linfáticos; **N3a** – invasão de sete a quinze nodos linfáticos; **N3b** – invasão de mais de 15 nodos linfáticos proximais; **M0** – sem metástases em outras partes do corpo; **M1** – presença de metástases. [28]

São usados vários meios complementares de diagnóstico para definir cada componente da nomenclatura TNM. Nomeadamente, para obter informações referentes ao T e ao N usam-se endoscopias digestivas altas, com ou sem biópsias; N e M são ainda avaliadas com recurso a tomografias computacionais ao peito, abdómen e pélvis. Em certos casos, pode ser necessário usar outros meios, tais como a tomografia por emissão de positrões e a laparoscopia diagnóstica. Nestes casos é possível obter informações mais precisas sobre o estadiamento M [27].

Na Figura 2.6 encontra-se uma representação da evolução dos diferentes estadios do cancro gástrico.



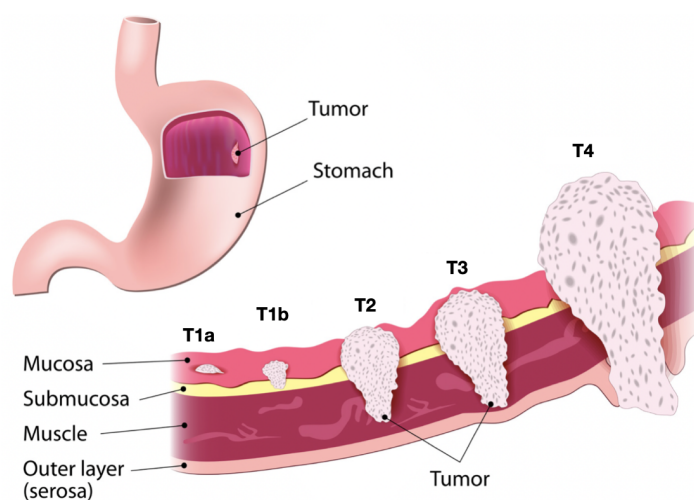


Figura 2.6: Representação da evolução dos diferentes estádios do cancro gástrico. Imagem adaptada de [29].

Relativamente aos métodos de tratamento, o mais eficaz continua a ser a cirurgia, em que pode ocorrer a remoção apenas do tumor, sempre acompanhada da remoção dos nodos linfáticos próximos, ou a remoção total do estômago. O tipo de abordagem cirúrgica depende da localização e do estágio do tumor. A quimioterapia é também encarada como um tratamento coadjuvante à cirurgia [27].

### 2.3 Cancro gástrico difuso hereditário

Como descrito na Secção 2.2, da totalidade de diagnósticos de cancro gástrico difuso (CGD), aproximadamente 40% são esporádicos, sendo que 1 a 3% têm ligações a fatores hereditários, ou seja, são considerados cancros gástricos difusos hereditários. Assim, de uma forma geral, o cancro gástrico difuso hereditário (CGDH) é uma síndrome cancerígena autossómica dominante, caracterizada por um elevado risco de desenvolvimento de cancro gástrico difuso e cancro da mama lobular invasivo (CMLI) [30].

O CGDH foi originalmente detetado em 1964, na Nova Zelândia, em três famílias *Maori* com CGD. Oito membros da família apresentaram cancro gástrico em idades muito precoces (31 a 65 anos) ao longo de quatro gerações. A análise deste padrão levou à identificação de um gene supressor tumoral, o CDH1, como uma variante da linhagem germinativa causadora daquele tipo de cancro gástrico identificado. Assim, de acordo com o relatório original, ficou comprovado que a maioria dos casos de cancro gástrico difuso confirmados tinham origem hereditária nas variantes patogénicas do gene CDH1. Recentemente, outras variantes patogénicas de genes,



como o CTNNA1, o PALB2 e o MAP3K6, foram também associadas à origem do CGDH. No entanto apenas foi possível estabelecer causalidade com o gene CTNNA1, o que levou, em 2020, a uma atualização das diretrizes expressas pelo *International Gastric Cancer Linkage Consortium* (IGCLC) e que definem o CGDH pela presença de variantes patogênicas CDH1 ou CTNNA1 num caso isolado, ou numa família com dois ou mais casos de CGD em familiares de primeiro ou segundo grau. Isto significa que o foco está no genótipo e na forte predisposição para o desenvolvimento de cancro gástrico [31].

A presença de variantes patogênicas CDH1 e/ou CTNNA1 conferem um risco estimado de 70% nos homens e 56% em mulheres de desenvolver cancro gástrico difuso, o que determina como principal meio preventivo a gastrectomia total profilática. Esta é recomendada para indivíduos que preencham os critérios que definem o CGDH. Associado a este tipo de cancro pode estar ainda o cancro da mama lobular invasivo (CMLI), sendo que aproximadamente 50% das mulheres com CGDH têm risco de o desenvolver [31].

### 2.3.1 Origem

Mutações no gene CDH1 e/ou CTNNA1 estão na origem do CGDH [31]. O gene CDH1 codifica a expressão da E-caderina, localiza-se no cromossoma 16q22.1 e possui 16 exões. Mais de 100 variantes patogênicas do CDH1 têm sido descritas como presentes em famílias com prevalência de CGDH. As mutações que caracterizam estas variantes estão presentes em todo o gene, incluindo nos intrões e exões. As mutações mais recorrentes são as pequenas inserções e deleções, as mutações do tipo *missense* (nas quais a mutação de uma base codifica um novo aminoácido que conduz a uma alteração da função da proteína), as mutações de mudança de sítio e as grandes deleções de exões e mutações do tipo *nonsense* (nas quais a mutação resulta no códon de terminação, truncando a proteína) [1]. No entanto não há evidências de correlação entre o fenótipo e a localização ou tipo de mutação presente no gene CDH1. Porém, em 80% dos casos, as mutações prevalentes no gene são do tipo truncado em que se verifica uma prematura ocorrência de códon stop. Nos restantes 20% dos casos de CGDH a principal mutação identificada é do tipo *missense*, resultando em moléculas de E-caderina com uma única substituição de um aminoácido. Este tipo de mutações resultam num problema sério em termos genéticos e em propostas de possíveis tratamentos, já que o impacto na função da proteína é imprevisível [1].

As mutações que potenciam a perda de função da linha germinativa do CDH1 ocorrem em aproximadamente 40% dos casos detetados de CGDH. Contudo, Melo *et al.* (2017) [32] propõem que a inativação do alelo funcional remanescente, por ação de um segundo mecanismo molecular,

leve à inativação bialélica do gene, o que desencadeia o desenvolvimento de cancro gástrico do tipo difuso. De acordo com a mesma fonte, foi demonstrado que a hipermetilação é a causa mais frequente deste segundo mecanismo molecular, surgindo em 50% dos casos diagnosticados, sendo que possíveis mutações ou deleções são menos frequentes nestes mecanismos.

Comparativamente às formas esporádicas de CGD, as alterações genéticas no CDH1, no caso de doentes com CGDH, estão presentes em toda a extensão do gene, o que não se verifica nos casos esporádicos, onde as mutações se concentram, maioritariamente, nos exões 7 e 9 [1].

Ao contrário de outros tumores, a perda completa de expressão do gene CDH1 não é condição suficiente para o desenvolvimento de carcinomas invasivos; são necessárias outras modificações em genes como Smad4 e p53 para que se manifeste a forma mais agressiva de cancro gástrico difuso ou metástases. Esta conclusão foi obtida por Pereira *et al.* (2006) [33] e por Park *et al.* (2014, 2018) [34, 35] através de experiências usando ratos. Segundo Pilonis *et al.* (2021) [31], 56% dos carcinomas invasivos apresentam anomalias na expressão da p53, enquanto estadios iniciais de CGDH têm uma resposta imunorreativa normal, isto é, a expressão da p53 é normal, o que sugere que pode ser considerada como um biomarcador da progressão tumoral [31].

Outros estudos reportam interações entre a E-caderina e o *Human epitelial growth factor receptor 2* (HER2) através de interações com  $\beta$ -, p120-, e  $\alpha$ -catenina que potenciam a diminuição da mediação da adesão celular por parte das E-caderinas, o que facilita a invasão e migração tumoral [1]. O HER2 é um recetor que funciona como fator de crescimento e que está associado a mecanismos de diferenciação celular, adesão e apoptose. Através de ensaios imunohistoquímicos demonstrou-se uma expressão excessiva do HER2 em adenocarcinomas gástricos, porém é mais evidente em carcinomas do tipo intestinal. Estas relações não apresentam ainda muitas evidências científicas da ligação entre o HER2 e o CGDH [36].

Quanto ao gene CTNNA1, este codifica a  $\alpha$ -E-catenina, uma proteína que interage com a E-caderina: o terminal-N da  $\alpha$ -E-catenina liga-se à  $\beta$ -catenina, que por sua vez se liga diretamente ao terminal-C da E-caderina. Na Figura 2.7 encontra-se representado um diagrama que descreve o papel da E-caderina na adesão celular, bem como as suas ligações aos três tipos de cateninas presentes nas células.

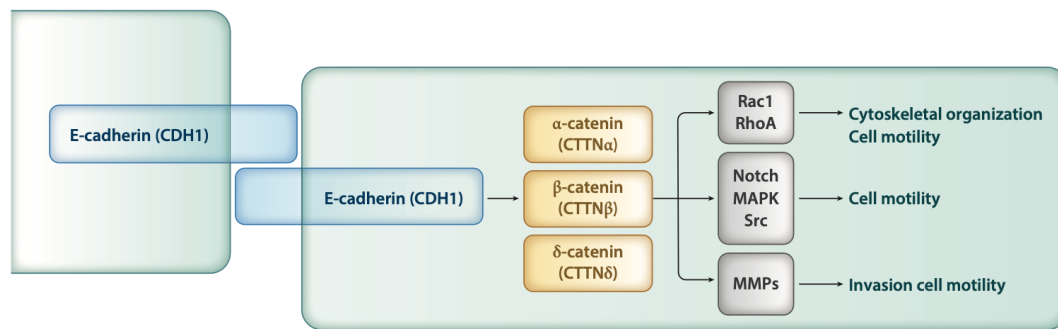


Figura 2.7: Representação da ação da E-caderina, da sua ligação às cateninas e da expressão de genes.

Imagem adaptada de [31].

A E-caderina pertence à família das caderinas, que consiste num grupo de glicoproteínas que medeiam a adesão celular [1]. É uma proteína transmembranar, cujo domínio extracelular intervém nas interações homofílicas específicas com as células vizinhas, enquanto o domínio intracelular se liga às cateninas alfa, beta e delta. Estas, por sua vez, ligam-se à actina do citoesqueleto, formando junções aderentes estáveis [31], influenciando a forma, polaridade e função das células do epitélio [32]. Desta forma, tanto o gene CDH1 como o CTNNA1 estão intimamente ligados aos processos de adesão celular, daí que mutações nestes genes estejam associadas a perdas de adesão nas células, formando tipos de cancro gástrico difuso.

A adesão celular é preponderante para a manutenção da morfogénese e homeostasia dos tecidos. Contudo, é também crucial no que diz respeito à ativação de outros processos celulares, nomeadamente a diferenciação, a sobrevivência e a migração celular através do controlo da expressão de determinados genes, bem como da ativação de vias de sinalização específicas [32].

Histologicamente o CGDH caracteriza-se pela presença de lesões em forma de anel de sinete, porém a sua origem celular ainda não é bem aceite na comunidade científica. Humar *et al.* (2007) [37] estabeleceram que o CGDH se desenvolvia, maioritariamente, na região superior do pescoço das invaginações do epitélio que reveste o estômago, o que levou a perspetivar que a origem celular do CGDH pudesse estar ligada às células estaminais, por serem as principais células presentes nessa região. Tal como já referido na Secção 2.2, o CGD desenvolve-se maioritariamente na região central do estômago, ou seja, no corpo. Aí a região do pescoço das invaginações é formada principalmente por células parietais e mucosas, tal como é evidente na Figura 2.3. Waldum *et al.* (2014) [38] propuseram que a origem celular do CGDH seriam as células neuroendócrinas, uma vez que estas estão sujeitas a uma perda de expressão de E-caderina. Todavia, estudos de *knock-out* de CDH1 em modelos animais mostraram que as células parietais podem migrar

na lâmina própria, mimetizando o carcinoma com células em anel de sinete, o que sugere que as células parietais possam estar na origem das estruturas em anel de sinete que caracterizam, histologicamente, o CGDH [1].

### 2.3.2 Diagnóstico e monitorização

Em 2020, o IGCLC reformulou os critérios de deteção genética do CGDH. Esses critérios estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Critérios genéticos de identificação de cancro gástrico difuso hereditário. Adaptado da referência [31].

Ano	Gene	Critérios
2020	CDH1 CTNNA1 <sup>a</sup>	Indivíduos com idade inferior a 50 anos e com CGD
		Diagnóstico de CGD em indivíduos com qualquer idade e que pertençam à etnia Maori
		Diagnóstico de CGD em indivíduos com qualquer idade com histórico pessoal ou familiar (primeiro grau) de lábio/palato leporino
		Histórico de CGD e CML, ambos diagnosticados em idades inferiores a 70 anos
		Bilateral CML/CLIS, ambos diagnosticados em idades inferiores a 70 anos
		Presença de células em anel de sinete <i>in situ</i> e/ou propagação pagetoide de células em anel de sinete em indivíduos com idade inferior a 50 anos
		Dois ou mais casos de cancro gástrico diagnosticados na família, em qualquer idade, com pelo menos um identificado como CGD <sup>b</sup>
		Dois ou mais casos de CML diagnosticados em membros da família com menos de 50 anos de idade <sup>b</sup>
		Um ou mais casos diagnosticados de CGD em qualquer idade e um ou mais casos de CML em idade inferior a 70 anos em diferentes membros da família <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Testado quando os critérios genéticos são válidos e nenhuma variante patogénica do gene CDH1 foi encontrada.

<sup>b</sup> Os membros familiares devem ter relações consanguinidade de primeiro ou segundo grau. Abreviaturas: CGD, cancro gástrico difuso; CML, cancro da mama lobular; CLIS, carcinoma lobular *in situ*.

Para além destes testes genéticos que apenas revelam a predisposição para o desenvolvimento de cancro gástrico difuso hereditário, a sua presença real é um pouco mais difícil de ser diagnosticada, uma vez que em fases precoces do desenvolvimento de CGDH as estruturas que o caracterizam histologicamente, como é o caso das estruturas em anel de sinete, não são bem visíveis através de meios complementares de diagnóstico. Isto implica que o CGDH seja detetado em fases mais avançadas, o que pode condicionar as formas de tratamento passíveis

de serem usadas [31]. O principal meio de diagnóstico usado é a endoscopia digestiva alta (ver Figura 2.8); porém, nestas o estadio inicial do desenvolvimento do cancro é muito difícil de ser detetado, mesmo por profissionais experientes no diagnóstico deste tipo de patologias. Teoricamente, estima-se que sejam necessárias 1768 biópsias para assegurar uma taxa de 90% de deteção de apenas um foco de células tumorais [1].

As endoscopias digestivas altas devem ser realizadas anualmente quando os critérios genéticos são aplicáveis, ou com periodicidade de seis meses quando são detetados estadios iniciais de CGDH. Nestes casos, são ainda realizadas biópsias durante as endoscopias. As recomendações atuais, definidas pelo protocolo de Cambridge, sugerem que devem ser realizadas um total de 30 biópsias: 5 na região do antro, zona de transição, fundo e cardia e 10 na região do corpo onde, maioritariamente, se desenvolve o CGDH. Posteriormente, a partir de análises histológicas às biópsias realizadas é possível detetar a presença de estruturas anómalas e características do CGDH [31].

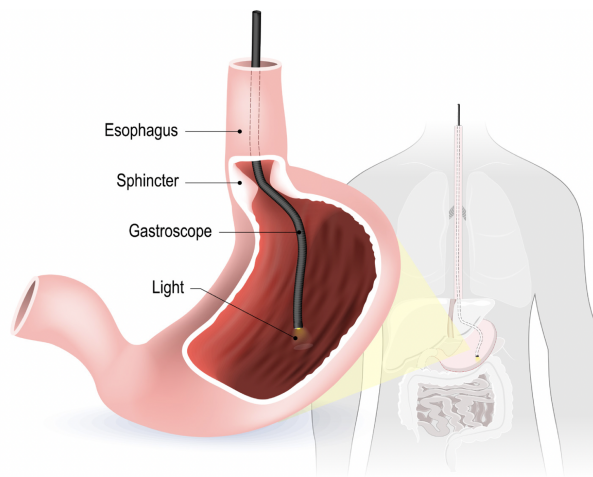


Figura 2.8: Representação do procedimento de uma endoscopia digestiva alta usada como meio de diagnóstico do cancro gástrico.

Imagem adaptada de [29].

### 2.3.3 Tratamento

Como o diagnóstico precoce do CGDH é difícil, quando os critérios genéticos são aplicáveis, para doentes com idades entre 20 e 30 anos a realização de uma gastrectomia total profilática é recomendada, para evitar o desenvolvimento de cancro gástrico difuso; porém para doentes com idades superiores a 70 anos as gastrectomias são desencorajadas. Muitos doentes preferem adiar este procedimento por questões socioeconómicas ou psicossociais, por isso a estes doentes é-lhe recomendado a realização de endoscopias de vigilância. Todavia, como já referido na secção

anterior, nem sempre as endoscopias são capazes de prever o desenvolvimento de CGDH [31].

Atualmente a cirurgia é a única opção viável para uma possível cura. Para além das gastrectomias profiláticas, a remoção cirúrgica do tumor pode ser uma possibilidade de tratamento, sendo sempre acompanhada pela remoção dos nodos linfáticos próximos do tumor (Figura 2.9). Mas a abordagem cirúrgica depende da localização e estadió do tumor. Para estadios iniciais, o risco de invasão dos nodos linfáticos é reduzido, pelo que o tumor pode ser tratável com recurso à resseção endoscópica. Este tipo de tratamento em fases iniciais fornece baixas taxas de complicações e reaparecimento local do tumor, bem como boas taxas de sobrevivência a 5 anos, sendo indicado especificamente para doentes cujos tumores apresentam dimensões reduzidas, inferiores a 2cm, bem diferenciados e sem ulcerações.

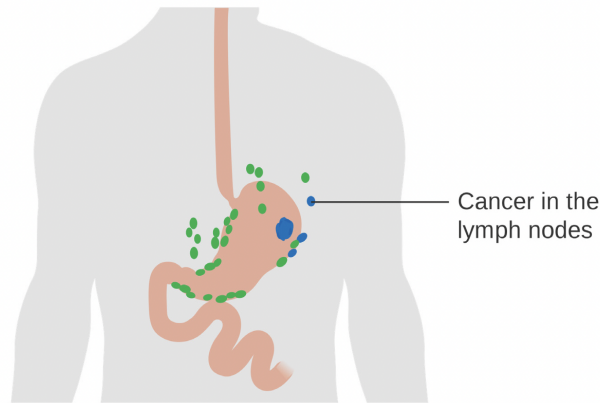


Figura 2.9: Nodos linfáticos próximos que, por norma, são removidos aquando das gastrectomias profiláticas.

Imagem adaptada de [29].

Para estadios mais avançados a gastrectomia é a única forma de tratamento possível, dependendo da estrutura e invasão do tumor. A gastrectomia pode ser realizada por laparoscopia, assistida por robô, ou aberta. O primeiro caso confere algumas vantagens, nomeadamente por ser uma técnica pouco invasiva, o que diminui a perda de sangue, o tempo de recuperação e aumenta a qualidade de vida quando comparada com a gastrectomia aberta. Quanto ao caso da gastrectomia assistida por robôs, confere algumas vantagens comparativamente à laparoscopia, possibilitando a utilização de uma câmara que permite obter imagens tridimensionais, com alta definição, estável e com um bom campo de visão para o operador. Este tipo de tratamento implica a utilização de equipamentos muito sofisticados.

Associado a estes tratamentos cirúrgicos surge a quimioterapia e a quimiorradioterapia usadas como métodos de tratamento adjuvante, permitindo, de acordo com a literatura, aumentar a sobrevivência dos doentes com cancros gástricos avançados [39].

### 2.3.4 Outras patologias associadas ao CGDH

O cancro gástrico difuso hereditário pode estar ainda associado a outros tipos de cancro, mas também a outras manifestações. O cancro da mama lobular é o segundo tipo de cancro mais comum associado ao CGDH. Em indivíduos com CGDH, o risco de desenvolver CMLI começa a aumentar antes dos 30 anos, com um risco cumulativo aos 80 anos variando entre 42% e 50%. Estima-se que aproximadamente 90% das formas invasivas de CMLI exibem perda de expressão da E-caderina, em contraste com o cancro da mama que se desenvolve nos ductos mamários, em que não há perda desta expressão da E-caderina. Este é o principal contributo histológico partilhado entre o cancro gástrico difuso e o cancro da mama lobular. Estes tumores não apresentam uma forma bem definida, sendo maioritariamente de reduzidas dimensões e com possíveis invasões das células epiteliais. Apresentam, ainda, uma elevada predisposição para a ocorrência de metástases no trato gastrointestinal e reprodutivo e na superfície do peritoneu. Apesar das ligações entre o CMLI, o CGDH e o gene CDH1, não há evidências histopatológicas ou imunohistológicas que distingam o CMLI com origem genética do esporádico [1].

Apesar de terem sido detetados alguns casos de cancro colo-retal associados a variantes patogénicas do CDH1, incluindo indivíduos em que foram identificadas estruturas em anel de sinete, o número de casos é muito reduzido para que este tipo de cancro possa estar ligado ao desenvolvimento de CGDH [1].

Em 2006 foi descrito pela primeira vez o aparecimento de lábio leporino e fenda palatina associado ao CGDH. Isto deve-se ao facto de que durante o desenvolvimento do embrião há uma elevada expressão do gene CDH1, pelo que a E-caderina apresenta um papel fundamental na formação do lábio e do palato. Ou seja, quando se verifica uma mutação no gene CDH1, há uma perda de expressão da E-caderina, o que influencia a formação do palato e do lábio aquando do desenvolvimento embrionário, daí que surjam casos de lábio leporino e fenda palatina associados ao CGDH [1].





# Capítulo 3

## Métodos

Neste capítulo serão apresentados os métodos utilizados no desenvolvimento do modelo computacional que descreve o cancro gástrico difuso hereditário. Na Secção 3.1 é descrito o modelo *cellular Potts*, a sua relação com o Hamiltoniano, como este se calcula e se aplica aos movimentos celulares usando o Algoritmo Metropolis-Hastings (AMH); são ainda enumeradas as etapas que constituem o modelo *cellular Potts*. Na Secção 3.2 é descrito o algoritmo *Connected Component Analysis* (CCA) utilizado para assegurar a conectividade entre as células no CPM. Por fim, na última secção (Secção 3.3), é descrito o modelo desenvolvido, bem como os requisitos necessários para a manutenção da homeostasia do mesmo, por forma a mimetizar o sistema biológico em causa, o cancro gástrico difuso hereditário.

### 3.1 *Cellular Potts Model* (CPM)

O *Cellular Potts Model* (CPM), também conhecido como modelo Glazier-Granier-Hogeweg ou GGH [40], foi apresentado por Glazier e Granier nos anos 90 como uma extensão do modelo large-Q Potts [41]. O CPM é um modelo computacional muito conhecido usado para descrever o comportamento das células e as suas interações com alta resolução [42], sendo utilizado em simulações que englobem, por exemplo, angiogénese, dispersão celular ou desenvolvimento tumoral [42]. O CPM pode ser desenvolvido a duas ou três dimensões: a duas dimensões baseia-se numa grelha quadrada onde os quadrados de menor dimensão constituem os pixels (Figura 3.1), enquanto que a três dimensões é usada uma grelha cúbica onde os cubos menores correspondem aos voxels, sendo que um conjunto de pixels /voxels forma uma célula [14,42].

Para um melhor entendimento, consideremos uma grelha bidimensional; no entanto a explicação é transversal para um modelo tridimensional, excetuando que, como já explicado, ao

invés de uma grelha quadrada formada por pixels em 2D teremos uma grelha cúbica com voxels em 3D.

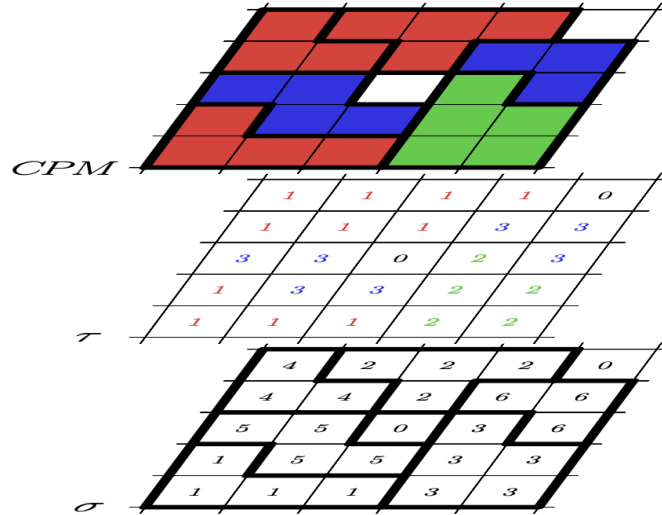


Figura 3.1: Esquema representativo da base do CPM. Num primeiro plano, identificado como CPM estão representados três tipos de células com diferentes cores (vermelho, azul e verde) delimitadas a negrito. Num plano intermédio,  $\tau$ , é definido o tipo da célula, identificado por números de 0 a 3 e, por fim, no plano  $\sigma$  é definida a identificação de cada célula.

Imagem de retirada de [43]

O modelo de *cellular Potts* simula a dinâmica de várias células que podem ser de tipos diferentes, tendo cada tipo celular propriedades morfológicas e de adesão específicas. Cada pixel/voxel  $i$  na simulação faz parte de uma célula número  $\sigma$  do tipo  $\tau$  (ver Figura 3.1). Assim, consideramos que:

- $\sigma(i)$  é a identificação da célula, em que  $i$  corresponde ao pixel/voxel da grelha.
- $\tau(\sigma(i))$  é o tipo da célula.

A evolução do sistema é estocástica e regulada por uma função que define a energia do sistema, o Hamiltoniano ( $\mathcal{H}$ ). Isto significa que o CPM é um modelo computacional baseado em energia e não em força, como acontece com outros modelos computacionais [14, 42]. O Hamiltoniano descreve as várias interações do sistema, quer em termos da preservação do volume das células, quer na energia na fronteira entre as mesmas. A evolução do modelo tem por base um procedimento de atualização estocástica, em que são consideradas perturbações aleatórias na forma das células, sendo que estas atualizações são aceites ou rejeitadas consoante as alterações produzidas no valor do Hamiltoniano.

### 3.1.1 Hamiltoniano

A energia efetiva ou Hamiltoniano de energia é definida como uma soma de energias que incorporam diferentes comportamentos celulares. Desta forma, o Hamiltoniano é composto por duas contribuições fundamentais: uma referente à energia de adesão célula-célula ( $\mathcal{H}_{adesão}$ ) e outra que define o volume de cada célula ( $\mathcal{H}_{volume}$ ). No entanto, no modelo desenvolvido é ainda adicionada uma componente que restringe a área de uma célula, no caso, afetando apenas as células tumorais ( $\mathcal{H}_{área}$ ).

$$\mathcal{H}_{CPM} = \mathcal{H}_{adesão} + \mathcal{H}_{volume} + \mathcal{H}_{área} \quad (3.1)$$

A componente de adesão é definida tendo em conta o tipo de célula:

$$\mathcal{H}_{adesão} = \sum_{\langle ij \rangle} J_{\tau(\sigma_i)\tau(\sigma_j)} (1 - \delta_{\sigma_i\sigma_j}) \quad (3.2)$$

$J$  corresponde à energia na fronteira de duas células do tipo  $\tau(\sigma(i))$  e  $\tau(\sigma(j))$ , respetivamente, na interface de dois pixels vizinhos.  $\langle ij \rangle$  é uma notação abreviada para a soma sobre cada par de vizinhos mais próximos  $i$  e  $j$ . Assumindo que todas as células são do mesmo tipo e que a matriz é simétrica,  $J_{\tau(\sigma(i))\tau(\sigma(j))} = J_{\tau(\sigma(j))\tau(\sigma(i))}$ , então, existem dois parâmetros de penalização de adesão: a penalização de adesão célula-matriz,  $J_{01}$ , e célula-célula  $J_{11}$  [44]. O termo  $\delta_{(\sigma_i\sigma_j)}$  corresponde ao delta de Kronecker [44].

$$\delta_{\sigma_i\sigma_j} = \begin{cases} 1, & \sigma_i = \sigma_j \\ 0, & \sigma_i \neq \sigma_j \end{cases} \quad (3.3)$$

Se  $\sigma(i) = \sigma(j)$ , os pixels localizados nas posições  $i$  e  $j$  da grelha quadrada pertencem à mesma célula e, por isso, o termo  $\delta_{(\sigma_i\sigma_j)}$  é igualado a 1 e esse par de pixels não contribui para o termo de adesão do Hamiltoniano. Por outro lado, se  $\sigma(i) \neq \sigma(j)$ ,  $\delta_{(\sigma_i\sigma_j)} = 0$  [42].

A componente de energia que restringe a variação de volume da célula é definido pela Equação 3.4.

$$\mathcal{H}_{volume} = \sum_{\sigma=1}^N \lambda_{\tau(\sigma)}^V \left( \frac{V(\sigma) - V_{\tau(\sigma)}^T}{V_{\tau(\sigma)}^T} \right)^2 \quad (3.4)$$

$\lambda_{\tau(\sigma)}^V$  corresponde a uma penalização de energia elástica devido às variações de volume de cada célula,  $V(\sigma)$ , comparativamente ao volume alvo,  $V_{\tau(\sigma)}^T$  [14, 44]. Este parâmetro pode ser ainda considerado como a rigidez da célula [42]. Tendo em conta o esquema da Figura 3.1 e a repre-

sentação de cada célula na grelha, é possível definir o seu volume pela Equação 3.5,

$$V(\sigma(i)) = \sum_j \delta_{\sigma(i)\sigma(j)} \quad (3.5)$$

Por norma as células têm um volume preferencial, o volume alvo da célula, que pode depender do tipo de célula,  $V_{\tau(\sigma)}^T$ , que, por isso, deve corresponder a um mínimo de energia. A componente de energia que restringe a variação da área de uma célula é definida pela Equação 3.6,

$$\mathcal{H}_{\text{área}} = \sum_{\sigma=1}^N \lambda_{\tau(\sigma)}^A \left( \frac{A(\sigma) - A_{\tau(\sigma)}^T}{A_{\tau(\sigma)}^T} \right)^2 \quad (3.6)$$

Comparando as Equações 3.4 e 3.6, as semelhanças são notórias, pelo que a explicação da componente de energia que descreve a área é semelhante à que define o volume.  $\lambda_{\tau(\sigma)}^A$  representa a penalização em energia da variação da área de superfície de uma célula,  $A(\sigma)$ , em relação à área alvo  $A_{\tau(\sigma)}^T$  [14].

A área de superfície de uma célula em 3D é definida como o número de voxels da célula em causa que estão em contacto com as células vizinhas [14]. Para efeitos desta contagem utilizou-se uma vizinhança de von Neumann, que num modelo tridimensional é definida pelos seis elementos vizinhos mais próximos (Figura 3.2).

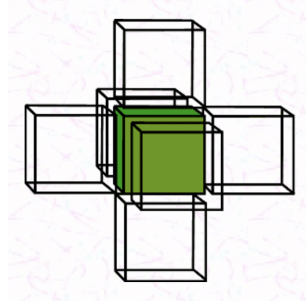


Figura 3.2: Vizinhança de von Neumann tridimensional. O elemento a verde representa o voxel escolhido e os elementos à sua volta correspondem aos 6 voxels vizinhos mais próximos.

Imagem de domínio público em [45]

De realçar que a componente de energia que restringe a área apenas foi aplicada às células tumorais, para reproduzir a forma da célula relativamente ao exposto na histologia. De acordo com o tipo de simulação que se pretende fazer, podem ser adicionados outros termos ao Hamiltoniano, por exemplo, termos correspondentes a restrições de perímetro, quimiotaxia<sup>1</sup> e durotaxia<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Migração celular em direção ou na direção oposta, a um gradiente químico [46].

<sup>2</sup>Tipo de migração celular, em que as células se movem segundo gradientes de rigidez, devido a propriedades estruturais da matriz extracelular [47]

Contudo, no modelo descrito na presente dissertação apenas foram usados os três termos já explicados, o termo de adesão, o de volume e o de área (Equação 3.7).

$$\begin{aligned}
 \mathcal{H} &= \mathcal{H}_{\text{adesão}} + \mathcal{H}_{\text{volume}} + \mathcal{H}_{\text{área}} = \\
 &= \sum_{\langle ij \rangle} J_{\tau(\sigma_i)\tau(\sigma_j)} (1 - \delta_{\sigma_i\sigma_j}) + \sum_{\sigma=1}^N \left[ \lambda_{\tau(\sigma)}^V \left( \frac{V(\sigma) - V_{\tau(\sigma)}^T}{V_{\tau(\sigma)}^T} \right)^2 + \right. \\
 &\quad \left. + \lambda_{\tau(\sigma)}^A \left( \frac{A(\sigma) - A_{\tau(\sigma)}^T}{A_{\tau(\sigma)}^T} \right)^2 \right]
 \end{aligned} \tag{3.7}$$

### 3.1.2 Algoritmo Metropolis-Hastings (AMH)

Para se avaliar se um movimento das células é ou não passível de ser aceite, é necessário determinar a variação de energia entre duas configurações,  $\Delta\mathcal{H}$ , para que ocorra uma minimização do Hamiltoniano. No entanto, antes de ocorrer o movimento das células é necessário avaliar a vizinhança de  $i$ ,  $\langle ij \rangle$ , que deve ser definida através da vizinhança de von Neumann (Figura 3.2).

No modelo desenvolvido consideramos uma vizinhança com 6 elementos (ver Figura 3.2).

O movimento das células no CPM é simulado recorrendo ao Algoritmo Metropolis-Hastings (AMH). A aplicação do AMH ao CPM consiste na escolha de um voxel alvo e de um voxel de origem, escolhido aleatoriamente na vizinhança do voxel alvo. Posteriormente, é testada a cópia da identificação do voxel de origem para o voxel alvo, correspondendo a uma variação de energia de  $\Delta\mathcal{H}$ . Esta variação de energia é definida pela Equação 3.8.

$$\Delta\mathcal{H} = \Delta\mathcal{H}_{\text{adesão}} + \Delta\mathcal{H}_{\text{volume}} + \Delta\mathcal{H}_{\text{área}} \tag{3.8}$$

Considerando  $t$  como a designação do elemento alvo e  $s$  do elemento de origem, é possível simplificar a equação que define a variação de energia devido à penalização de adesão (Equação 3.9),

$$\Delta\mathcal{H}_{\text{adesão}} = \sum_{\langle ti \rangle} [J_{\tau(\sigma(s))\tau(\sigma(i))} (1 - \delta_{\sigma(s)\sigma(i)}) - J_{\tau(\sigma(t))\tau(\sigma(i))} (1 - \delta_{\sigma(t)\sigma(i)})] \tag{3.9}$$

A variação de energia devido à penalização de volume pode também ser definida pela Equação 3.10,

$$\begin{aligned}
 \Delta\mathcal{H}_{\text{volume}} &= \frac{\lambda_{\tau(\sigma(t))}^V}{V_{\tau(\sigma(t))}^T} \left[ \left( V(\sigma(t)) - 1 - V_{\tau(\sigma(t))}^T \right)^2 - \left( V(\sigma(t)) - V_{\tau(\sigma(t))}^T \right)^2 \right] \\
 &\quad + \frac{\lambda_{\tau(\sigma(s))}^V}{V_{\tau(\sigma(s))}^T} \left[ \left( V(\sigma(s)) + 1 - V_{\tau(\sigma(s))}^T \right)^2 - \left( V(\sigma(s)) - V_{\tau(\sigma(s))}^T \right)^2 \right]
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

Porém, a Equação 3.10 pode, ainda, ser simplificada, obtendo a Equação 3.11.

$$\begin{aligned} \Delta \mathcal{H}_{\text{volume}} = & \frac{\lambda_{\tau(\sigma(t))}^V}{V_{\tau(\sigma(t))} T^2} \left[ 1 - 2 \left( V(\sigma(t)) - V_{\tau(\sigma(t))}^T \right) \right] + \\ & + \frac{\lambda_{\tau(\sigma(s))}^V}{V_{\tau(\sigma(s))} T^2} \left[ 1 + 2 \left( V(\sigma(s)) - V_{\tau(\sigma(s))}^T \right) \right] \end{aligned} \quad (3.11)$$

Como já referido anteriormente, as componentes de energia que restringem o volume e a área da célula são muito semelhantes, pelo que a explicação das equações que descrevem estas componentes são idênticas.

A Equação 3.12 representa a componente de energia que restringe a área, sendo a sua simplificação a Equação 3.13.

$$\begin{aligned} \Delta \mathcal{H}_{\text{área}} = & \frac{\lambda_{\tau(\sigma(t))}^A}{A_{\tau(\sigma(t))} T^2} \left[ \left( A(\sigma(t)) - 1 - A_{\tau(\sigma(t))}^T \right)^2 - \left( A(\sigma(t)) - A_{\tau(\sigma(t))}^T \right)^2 \right] \\ & + \frac{\lambda_{\tau(\sigma(s))}^A}{A_{\tau(\sigma(s))} T^2} \left[ \left( A(\sigma(s)) + 1 - A_{\tau(\sigma(s))}^T \right)^2 - \left( A(\sigma(s)) - A_{\tau(\sigma(s))}^T \right)^2 \right] \end{aligned} \quad (3.12)$$

$$\begin{aligned} \Delta \mathcal{H}_{\text{área}} = & \frac{\lambda_{\tau(\sigma(t))}^A}{A_{\tau(\sigma(t))} T^2} \left[ 1 - 2 \left( A(\sigma(t)) - A_{\tau(\sigma(t))}^T \right) \right] + \\ & + \frac{\lambda_{\tau(\sigma(s))}^A}{A_{\tau(\sigma(s))} T^2} \left[ 1 + 2 \left( A(\sigma(s)) - A_{\tau(\sigma(s))}^T \right) \right] \end{aligned} \quad (3.13)$$

Para que a escolha dos elementos seja aleatória, a natureza estocástica do processo pode ser descrita usando a cadeia de Markov, caracterizada pelos estados do sistema e pelas probabilidades de transição entre eles.

Considerando  $p(x | x')$  como a probabilidade de transição da configuração  $x'$  para a configuração  $x$  e  $p^{(0)}(x)$  a probabilidade inicial da distribuição, então a probabilidade posterior da distribuição é definida pela Equação 3.14.

$$p^{(n+1)}(x) = \sum_{x'} p^{(n)}(x') p(x | x') \quad (3.14)$$

Tendo em conta o argumento da ergodicidade, após um grande número de etapas, existindo uma distribuição estacionária, o sistema converge para  $\pi(x)$ , tal que:

$$\pi(x) = \sum_{x'} \pi(x') p(x | x') \quad (3.15)$$

Para garantir a invariância da equação, a condição de reversibilidade ou equilíbrio é condição

suficiente. Desta forma, pode ser escrita a Equação 3.16.

$$\pi(x)p(x' | x) = \pi(x')p(x | x') \quad (3.16)$$

O processo pelo qual uma nova configuração, para uma cadeia de Markov, é selecionada aleatoriamente pode ser separada na escolha aleatória de um candidato, de acordo com uma distribuição de probabilidade  $q(x', x)$ , e aceitá-la aleatoriamente tendo em conta outra distribuição de probabilidade  $\alpha(x', x)$ , desde que a condição de reversibilidade seja preservada. Isto significa que a probabilidade condicional é representada como:

$$p(x' | x)_{\text{MH}} = q(x', x) \alpha(x', x) \quad (3.17)$$

Estes passos definem uma nova configuração e, por isso, constituem o Algoritmo Metropolis-Hastings, sendo a condição de reversibilidade definida por:

$$\pi(x)q(x', x) \alpha(x', x) = \pi(x')q(x, x') \alpha(x, x') \quad (3.18)$$

Consequentemente, para manter a reversibilidade, a probabilidade de aceitação é dada por:

$$\alpha(x', x) = \begin{cases} 1 & \text{se } \pi(x)q(x', x) \geq \pi(x')q(x, x') \\ \frac{\pi(x')q(x, x')}{\pi(x)q(x', x)} & \text{se } \pi(x)q(x', x) < \pi(x')q(x, x') \end{cases} \quad (3.19)$$

Ou seja,

$$\alpha(x', x) = \min \left\{ 1, \frac{\pi(x')q(x, x')}{\pi(x)q(x', x)} \right\} \quad (3.20)$$

De realçar que se a distribuição de probabilidade do elemento escolhido for  $q(x', x) = q(x, x')$ , então a probabilidade de aceitação é apenas

$$\alpha(x', x) = \min \left\{ 1, \frac{\pi(x')}{\pi(x)} \right\} \quad (3.21)$$

Desta forma, o CPM usa o AMH para escolher aleatoriamente com igual probabilidade um elemento alvo e um elemento de origem na sua vizinhança. Se a nova configuração seguir os pressupostos do AMH, a condição  $q(x', x) = q(x, x')$  é assegurada e, por isso, a probabilidade de aceitação é definida pela Equação 3.21. Assim, a mudança de configuração do voxel é aceite ou rejeitada de acordo com a Equação 3.21, onde  $\pi(x)$  e  $\pi(x')$  definem a probabilidade dessas configurações em condições de equilíbrio, ou seja, usando a distribuição de Boltzman, descrita

pela Equação 3.22,

$$p_n = e^{-1-\alpha-\beta E_n} \propto e^{-\beta E_n} \quad (3.22)$$

em que  $p_n$  corresponde à probabilidade do sistema começar no estado  $n$ ,  $\alpha$  é o multiplicador de Lagrange,  $\beta$  representa a magnitude da flutuação de energia e  $E_n$  é a energia do estado  $n$  [43].

A taxa de aceitação é então definida pela Equação 3.23,

$$\alpha(x', x) = \min \left\{ 1, \frac{\pi(x')}{\pi(x)} \right\} = \min \left\{ 1, \frac{e^{-\beta E_{x'}}}{e^{-\beta E_x}} \right\} = \min \left\{ 1, e^{-\beta \Delta \mathcal{H}} \right\} \quad (3.23)$$

$\Delta \mathcal{H}$ , já mencionado anteriormente, foi obtido com recurso à Equação 3.8. Além disso, usando constantes de energia em unidades de  $\beta$ , a taxa de aceitação pode ser simplificada (Equação 3.24).

$$\alpha(x', x) = \min \{ 1, e^{-\Delta \mathcal{H}} \} \quad (3.24)$$

Assim, a probabilidade da cópia ser aceite é definida por:

$$P(\Delta \mathcal{H}) = \begin{cases} 1, & \Delta \mathcal{H} \leq 0 \\ e^{-\Delta \mathcal{H}}, & \Delta \mathcal{H} > 0 \end{cases} \quad (3.25)$$

O AMH é um dos muitos algoritmos de Monte Carlo associados às cadeias de Markov (MCMC) para amostragem da função de distribuição de probabilidade. Enquanto isso, para relacionar um passo do CPM a um intervalo de tempo, nos métodos MCMC normalmente é realizado um certo número de passos, daí o nome de passos de Monte Carlo (PMC), composto por um número de passos de AMH consecutivos igual ao número de voxels que formam a rede.

### 3.1.3 Etapas do CPM

Uma simulação de CPM é constituída por várias iterações, em que cada célula pode mover um voxel aleatório para dentro ou para fora em qualquer ponto da sua fronteira. Cada iteração engloba os seguintes passos (ver Figura 3.4):

1. É escolhido aleatoriamente um voxel alvo designado de  $t$ ;
2. É escolhido um segundo voxel, voxel de origem, na vizinhança do voxel alvo (considerando uma vizinhança de von Neumann formada por 6 elementos em 3D),  $s$ ;
3. Analisa a(s) célula(s) a que pertencem os voxels:



- (a) Se os voxels escolhidos pertencerem à mesma célula,  $\sigma(t) = \sigma(s)$ , a iteração é interrompida e inicia-se uma nova iteração no passo 1.
  - (b) Se os voxels escolhidos pertencerem a células diferentes,  $\sigma(t) \neq \sigma(s)$ , a iteração continua para o passo 4.
4. É avaliada a conectividade do voxel alvo. Para verificar se a célula alvo fica desconectada, então os seus elementos, excetuando o voxel alvo, são considerados os voxels de primeiro plano, aos quais é aplicado o algoritmo CCA (ver Secção 3.2), utilizando uma vizinhança de von Neumann com 6 elementos. Se formarem apenas um conjunto de voxels, tornando a célula conectada, é possível passar para o passo 5. Caso a célula alvo não fique conectada, então não é possível passar para o passo seguinte e a iteração termina.
  5. Cálculo da probabilidade da mudança do elemento  $t$  para o elemento  $s$ , de acordo com a Equação 3.25.
  6. Aceitação da mudança de  $t$  para  $s$ , de acordo com a probabilidade calculada no passo 4; isto significa que a célula à qual pertence o voxel de origem ganha um novo voxel, o voxel alvo, e a célula à qual este pertence, perde um elemento.

No diagrama da Figura 3.3 é possível resumir as etapas do CPM previamente descritas.

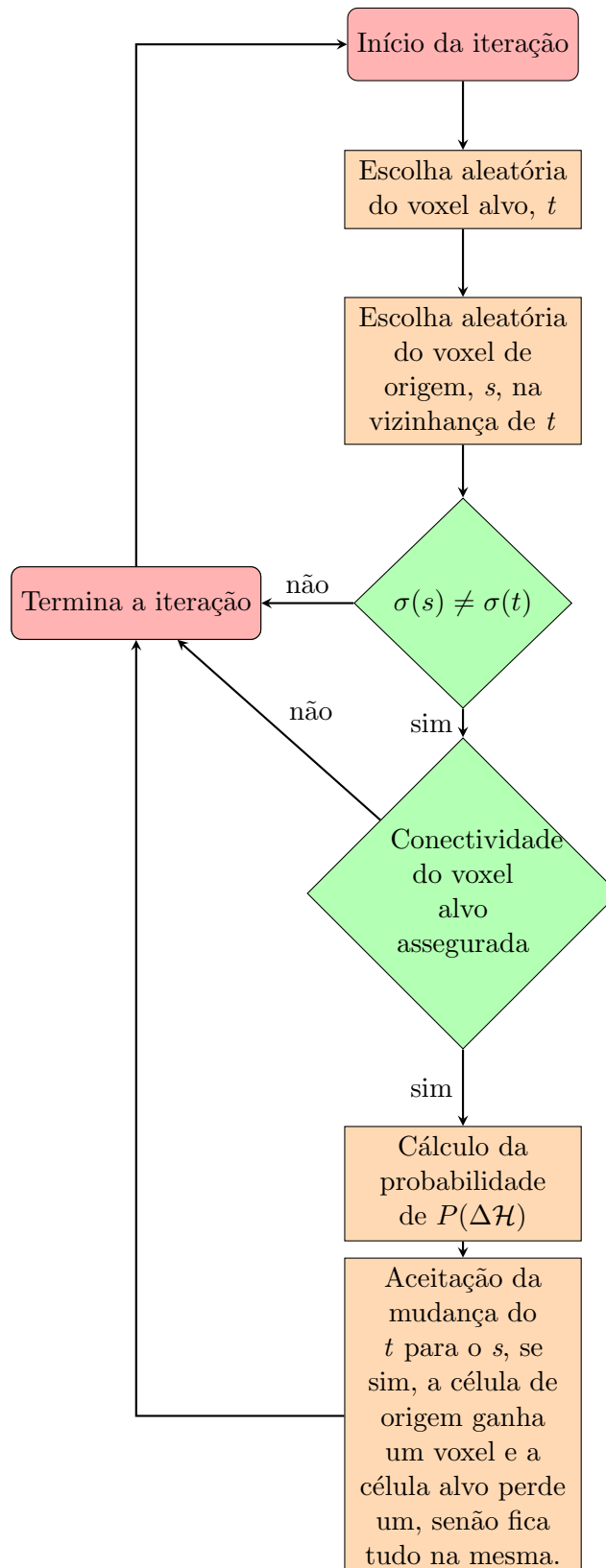


Figura 3.3: Diagrama de fluxo que representa cada iteração que constitui os passos de Monte Carlo.

Para um melhor entendimento, consideremos um esquema a duas dimensões, mas cuja explicação é transversal para um modelo tridimensional (Figura 3.4).

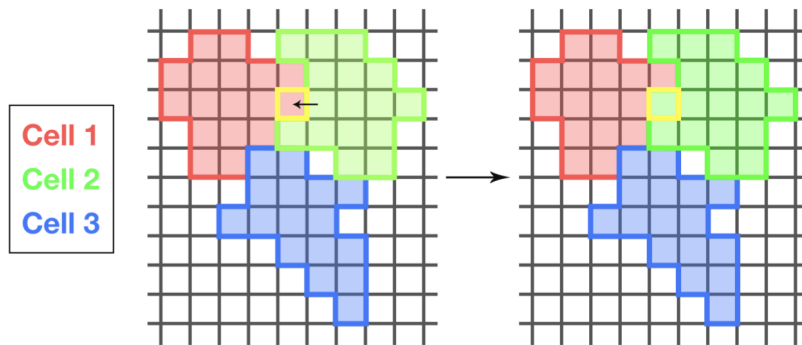


Figura 3.4: Esquema representativo das células do CPM e de uma tentativa de cópia de um elemento. O pixel identificado a amarelo corresponde ao pixel alvo escolhido aleatoriamente (faz parte da célula 1). A seta identifica o pixel de origem escolhido (faz parte da célula 2) também aleatoriamente na vizinhança do pixel alvo. Neste caso a tentativa de cópia é bem-sucedida, pelo que a célula verde (célula de origem) ganha um elemento e a célula vermelha (célula alvo) perde um elemento.

Imagem adaptada de [42].

### 3.2 *Connected Component Analysis (CCA)*

Um ponto importante que deve ser garantido quando é utilizado o CPM é a manutenção da conectividade entre as células, para que não ocorra a fragmentação das mesmas. A conectividade da célula alvo é verificada em cada iteração. Esta verificação preliminar consiste em inspecionar se a vizinhança do alvo está ou não conectada com o mesmo e se este não pertence à célula. Se estiverem conectados entre si independentemente do caminho escolhido, a mudança não compromete a conectividade; porém se a vizinhança não estiver conectada para além do alvo, a conectividade não é garantida. Para esta verificação é necessário aplicar o algoritmo *Connected Component Analysis (CCA)* (ver Figura 3.5).

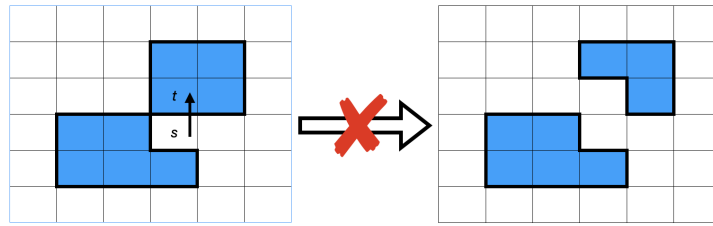


Figura 3.5: Avaliação da conectividade de uma célula. O pixel identificado por  $s$  corresponde ao pixel de origem e  $t$  ao pixel alvo. Se a cópia for aceite, o pixel alvo é convertido no pixel de origem e, nesse caso, a célula divide-se em duas, sem conectividade, o que não pode acontecer, logo a iteração do CPM é interrompida. Esta verificação é regulada pelo algoritmo CCA.

O algoritmo CCA é também designado de *connected component labeling*, ou seja, identifica e atribui um determinado rótulo exclusivo a conjuntos de pixels conectados de acordo com regras heurísticas específicas para cada caso concreto em que é aplicado. Um grupo de pixels está conectado quando quaisquer dois elementos estão conectados por pelo menos um caminho, que exclui os pixels fora desse conjunto considerado. Desta forma, um caminho é apenas um conjunto de conexões e uma conexão corresponde a dois pixels vizinhos um do outro.

Outros conceitos importantes neste algoritmo são o conceito de pixels de primeiro plano (pixels cuja conectividade está a ser analisada) e pixels de plano de fundo. Os critérios que determinam se um pixel pertence ao plano de fundo dependem exclusivamente do problema em que o CCA está a ser aplicado.

O algoritmo CCA implementado consiste em duas etapas em que são feitas duas análises aos pixels que formam a grelha, linha a linha e pixel a pixel. Na primeira análise é verificado cada pixel, o seu rótulo e a sua vizinhança. Primeiro averigua-se se pertence ao plano de fundo, se não pertencer analisa-se a sua vizinhança. Se os pixels vizinhos já estiverem rotulados, então o pixel analisado adquire o rótulo dos vizinhos, caso contrário é-lhe atribuído um novo rótulo. Na segunda análise é verificada a conectividade dos pixels. Se dois pixels com diferentes rótulos estiverem conectados, então um deles adquire o rótulo do outro e ficamos com um conjunto de pixels com o mesmo rótulo. No fim da segunda análise é feita uma nova rotulagem tendo em conta a lista de equivalências (ver Figura 3.6).

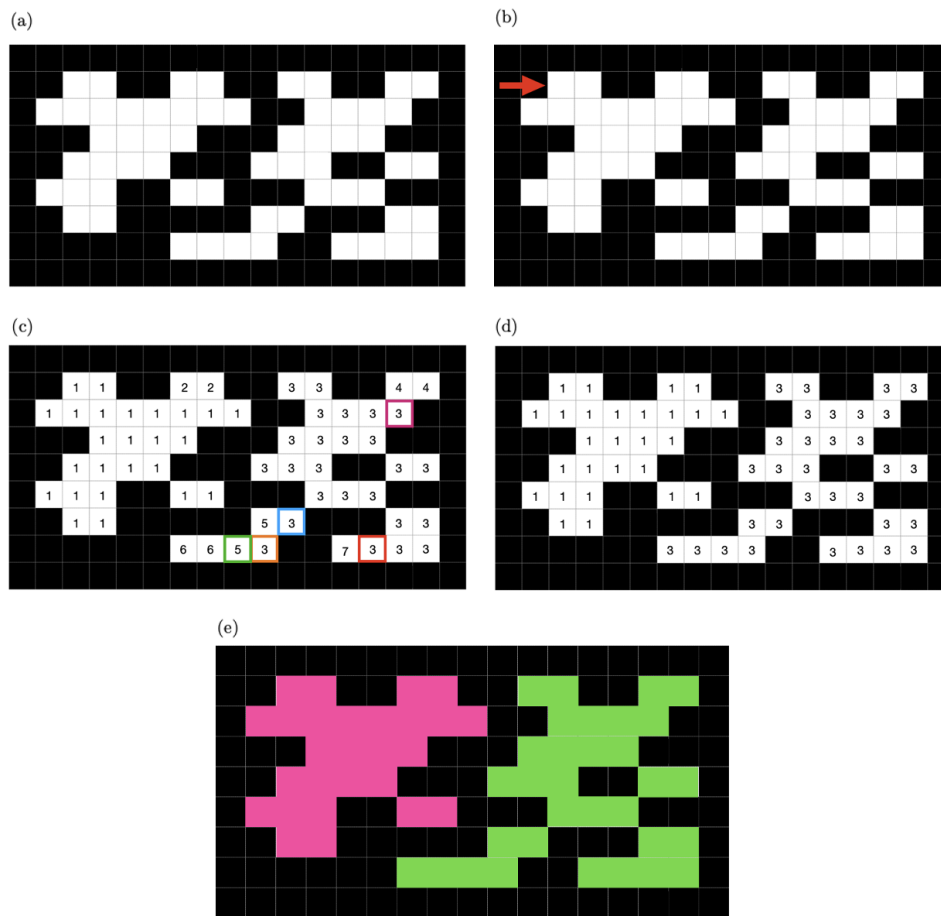


Figura 3.6: Algoritmo CCA. (a), (b) e (c) dizem respeito à primeira análise do algoritmo e (d) e (e) à segunda análise do algoritmo. Em (c), no quadrado azul, o pixel poderia adquirir dois rótulos, 3 ou 5, mas é escolhido o rótulo principal, o “mais antigo” (o que apresenta um menor valor). Assim na lista de equivalências o 5 torna-se 3. O mesmo acontece nos pixels representados a rosa, verde, laranja e vermelho. A lista de equivalências é então:  $1 \rightarrow 1, 2 \rightarrow 1, 4 \rightarrow 3, 5 \rightarrow 3, 6 \rightarrow 5, 7 \rightarrow 3$ .

### 3.3 Modelo desenvolvido

O modelo descrito na presente dissertação de mestrado é baseado na implementação de um modelo computacional, usando o CPM, adaptado do trabalho descrito por Carvalho *et al.* (2021) [14] para o desenvolvimento a três dimensões de tumores na bexiga.

No modelo aqui descrito é representado a três dimensões uma invaginação na região do corpo, estômago, onde, de acordo com o já descrito ao longo do Capítulo 2, se desenvolve o cancro gástrico difuso hereditário. Nesse mesmo capítulo foi aprofundado que este tipo de cancro se desenvolve na região superior do pescoço, pelo que o modelo apenas se foca na região do istmo e do pescoço, já que os tumores não têm implicações nas regiões da fossa e da base. O

modelo visa mimetizar a estrutura das invaginações representadas na Figura 2.3. Aí são visíveis os diferentes tipos de células que constituem estas regiões (células estaminais e progenitoras, no istmo, e células mucosas e parietais no pescoço). Assim, o modelo em causa usa o modelo *cellular Potts*, formado por sete tipos de células, descritas na Tabela 3.1. Cada célula que constitui a grelha apresenta um tipo bem definido, com características específicas. Diferentes células podem ser do mesmo tipo, porém cada célula corresponde a um único tipo.

Tabela 3.1: Tipo de células usadas no modelo.

Tipo de célula	Célula/tecido correspondente
1	Fluído intersticial
2	Células estaminais
3	Células progenitoras
4	Células mucosas
5	Células parietais
6	Células tumorais
7	Matriz Extra-Celular (MEC)

O designado fluído intersticial (tipo 1) corresponde à região central da invaginação, formada por uma estrutura com um comportamento semelhante a um líquido. As células estaminais (tipo 2) e progenitoras (tipo 3) constituem o istmo e as células mucosas (tipo 4) e parietais (tipo 5) constituem o pescoço das invaginações (ver Figura 2.3 para uma melhor visualização). A matriz extra-celular (MEC, tipo 7) corresponde a uma estrutura que envolve a invaginação e confere suporte às células.

As dimensões e forma dos diferentes tipos de células usadas mimetizam os modelos biológicos, sendo que os valores dos parâmetros apresentados na Secção 3.1.1 (ver Tabela 4.3) visam reproduzir o observado em sistemas reais.

### 3.3.1 Homeostasia

Os sistemas biológicos estão em constante mudança, principalmente devido à migração, morte e proliferação celular. No caso do modelo computacional desenvolvido, os movimentos celulares são simulados pelo Hamiltoniano ao longo dos PMC, enquanto a morte celular e a proliferação são implementadas por funções externas ao Hamiltoniano. A morte celular ocorre maioritariamente devido à pressão exercida pelas células tumorais que provocam uma diminuição do tamanho das células vizinhas, acabando estas por morrer. Quando isso acontece, a célula é substituída pela Matriz Extra-Celular. Relativamente à proliferação celular, esta é exclusiva das células tumorais, em que uma célula dá origem a duas (mitose) e assim sucessivamente, num processo

aleatório que ocorre de forma simétrica, com uma duração média do ciclo celular de 24 dias e desvio padrão de 3 dias (seguindo uma distribuição Gaussiana). Desta forma as células tumorais proliferam através de sucessivas mitoses. Este processo conduz a um aumento exponencial do volume tumoral, sendo que o volume alvo das células tumorais aumenta linearmente no tempo até atingir o dobro do volume alvo inicial. No entanto, o processo de proliferação é limitado, ou seja, não ocorre indefinidamente. Existe um limiar estabelecido que depende do volume e do tempo de proliferação das células tumorais. Isto é, uma célula tumoral só se divide por mitose se o seu volume for superior a 5% do seu volume alvo e, ao mesmo tempo se o tempo de proliferação for superior ao tempo limite de proliferação. Se estas condições forem cumpridas, a divisão celular ocorre simetricamente ao longo do menor plano vertical ou horizontal. Após a mitose, cada célula tumoral resultante fica com o volume alvo inicial e o tempo de proliferação é colocado a zero, iniciando-se uma nova contagem temporal com o início de um novo processo de proliferação.

É a partir destes movimentos, morte e proliferação celular que a homeostasia do modelo se mantém ao longo das simulações, sendo importante realçar que não ocorrem processos de diferenciação celular.





## Capítulo 4

# Resultados e Discussão

No presente capítulo serão apresentados os resultados do modelo descrito ao longo da dissertação, bem como a discussão dos mesmos. Na Secção 4.1 são apresentadas as condições iniciais do modelo, os valores de cada parâmetro do Hamiltoniano e os resultados das simulações com estes mesmo valores. Na Secção 4.2 é introduzida uma célula tumoral averiguando a sua influência e comparando os resultados com um outro modelo computacional, o *phase field model*. Seguidamente, na Secção 4.3 é analisada a variação de volume das células. Na Secção 4.4 são apresentados os resultados dos estudos que determinam a influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular e entre a célula tumoral e as restantes, tanto na distância de extrusão das células tumorais como no seu volume. Na Secção 4.5 é avaliada a influência da rigidez das células no seu desenvolvimento. Na Secção 4.6 é introduzida a proliferação celular da célula tumoral apresentando os resultados obtidos. Na parte final do capítulo é avaliada a influência da duração do ciclo celular (Secção 4.6.1) e a forma das células tumorais (Secção 4.6.2) comparando com os resultados histológicos e, por fim, a influência do desenvolvimento tumoral nas estruturas envolventes (Secção 4.6.3).

### 4.1 Condições iniciais

O modelo foi desenvolvido a partir de uma grelha tridimensional de  $100\mu m(x)$  por  $100\mu m(y)$  e por  $288\mu m(z)$ . Na Tabela 4.1 estão descritos os parâmetros iniciais que definem o CPM, nomeadamente o tamanho de cada voxel, o tempo correspondente a um passo de Monte Carlo em dias e a penalização em energia da interação célula-célula, a designada adesão célula-célula ( $J$ ). Os valores de adesão das células tumorais são diferentes deste valor inicialmente estabelecido, estando estes representados na Tabela 4.2. Na Tabela 4.3 são apresentados os valores iniciais

dos parâmetros aplicados no Hamiltoniano e descritos na Secção 3.1.1 para cada tipo de célula.

Tabela 4.1: Valores iniciais dos parâmetros do CPM.

Parâmetros	Valor
Tamanho de cada voxel	2,5 $\mu m$
Passo de Monte Carlo (PMC)	1 dia
Adesão célula-célula	$J_{ij} = 2,55(2,30)$ se $i \neq j$ ( $i = j$ )

Tabela 4.2: Valores de adesão tumor-células ( $J$ ).

	Fluído Intersticial	Células	Matriz
Tumor	10	6	1

**Nota:** Quanto maior o valor de  $J$ , menor a adesão célula-célula.

Tabela 4.3: Valores iniciais dos parâmetros usados no Hamiltoniano.

Tipo de célula	$\lambda^V$ (uni. arb)	Volume alvo (voxels <sup>3</sup> )	$\lambda^A$ (uni. arb)	Área alvo (voxels <sup>2</sup> )
<b>Fluído Intersticial</b>	$1 \times 10^7$	361 911	-	-
<b>Estaminal</b>	3000	786	-	-
<b>Progenitora</b>	3000	786	-	-
<b>Mucosa</b>	3000	786	-	-
<b>Parietal</b>	3000	786	-	-
<b>Tumoral</b>	4500	900	1350	270
<b>MEC</b>	$3 \times 10^7$	2 065 700	-	-

A representação do resultado da simulação decorrente dos valores iniciais dos parâmetros apresentados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 encontra-se na Figura 4.1, bem como cortes longitudinais e transversais (Figura 4.2), que evidenciam as semelhanças com o apresentado na literatura, nomeadamente na Figura 2.3 (Secção 2.1).

De referir que nas Figuras 4.1 e 4.2 os sete tipos de células estão identificados por cores: o fluído intersticial (tipo 1) está representado a azul, as células estaminais (tipo 2) a azul acinzentado, as células progenitoras (tipo 3) a azul-esverdeado, as células mucosas (tipo 4) a laranja-claro, as células parietais (tipo 5) a laranja-escuro, as células tumorais (tipo 6) a magenta, e a matriz extra-celular (tipo 7) a amarelo-claro. Nas referidas figuras não estão representadas células tumorais.

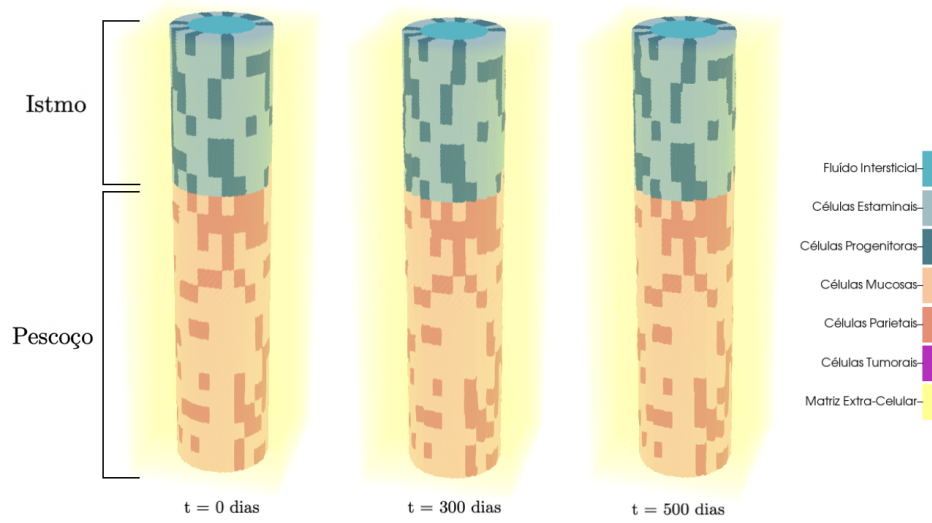


Figura 4.1: Evolução do modelo ao longo do tempo com as condições iniciais aplicadas.

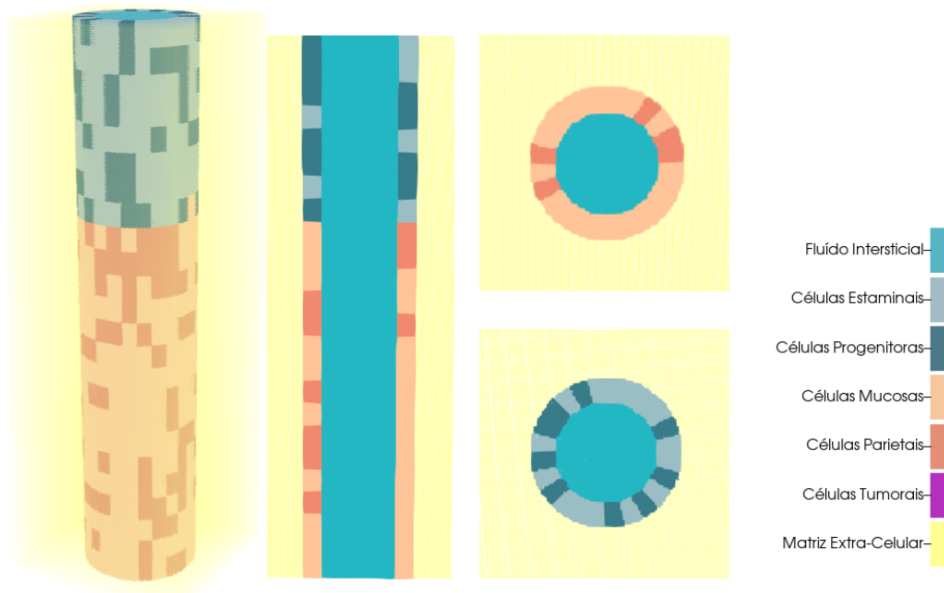


Figura 4.2: Modelo tridimensional e respectivos cortes longitudinal e transversal no início da simulação.

Analisando a Figura 4.1 é possível verificar que, a homeostasia tal como descrita na Secção 3.3.1, é mantida ao longo da simulação, o que significa que a integridade do modelo é assegurada.

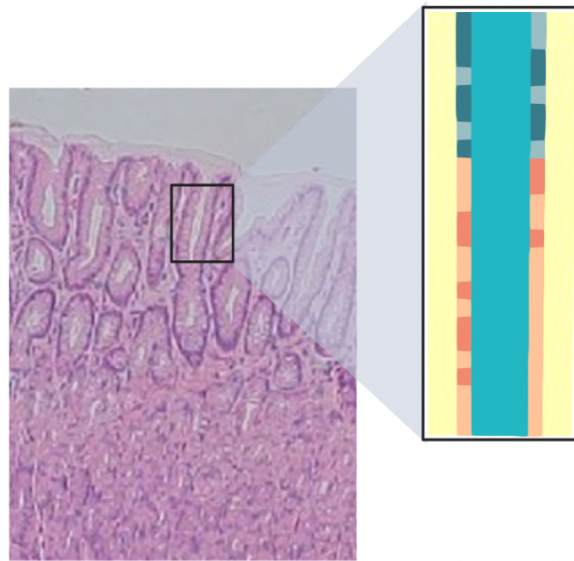


Figura 4.3: Comparação entre um corte histológico e um corte longitudinal do modelo desenvolvido.

Imagem adaptada de [50].

De acordo com a Figura 4.3 verifica-se que o modelo desenvolvido mimetiza corretamente os resultados histológicos, bem como a representação na qual se baseia (Figura 2.3).

## 4.2 Células tumorais

Na Secção 2.3.1 foi descrito que a potencial origem do CGDH seriam as células parietais da região superior do pescoço, nas invaginações que constituem o epitélio gástrico. Desta forma, e para que o modelo fosse o mais realista possível, considerou-se que uma célula parietal se converteria numa célula tumoral. Na Figura 4.4 é possível observar a evolução do modelo na presença de uma célula tumoral inicialmente sem considerar que possa proliferar. Esta será tida em conta mais à frente no presente capítulo.

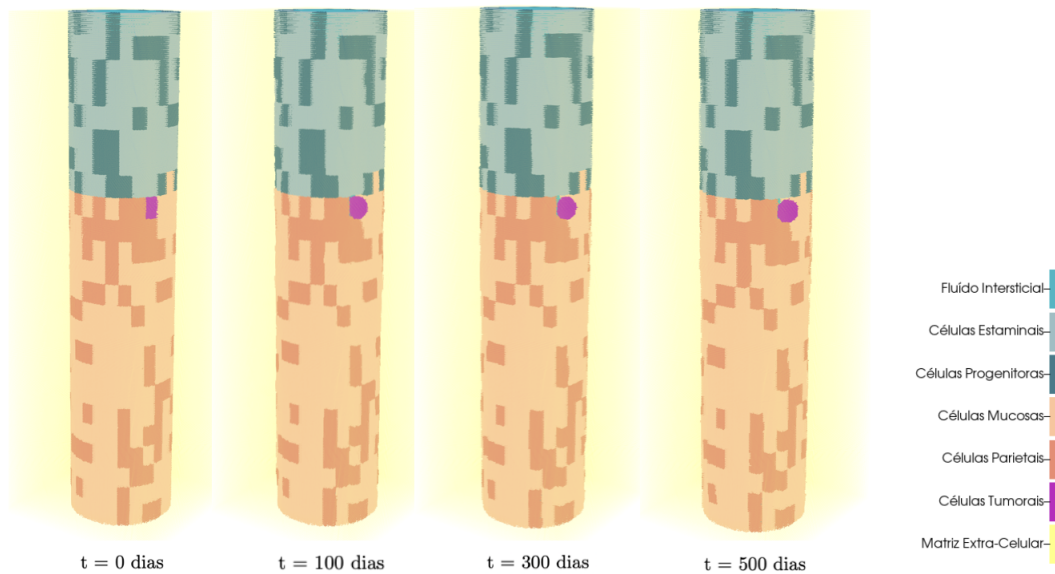


Figura 4.4: Evolução do modelo com a presença de uma célula tumoral, representada a magenta e localizada na região superior do pescoço em substituição de uma célula parietal. A célula tumoral não prolifera.

Pela Figura 4.4 verifica-se que a integridade da estrutura se mantém ao longo da simulação, apesar da presença de uma célula tumoral. Esta, por sua vez, altera ligeiramente a sua forma ao longo do tempo, tornando-se mais esférica e desenvolvendo-se na matriz extra-celular e não na estrutura da invaginação, ou seja, ocorre extrusão celular, o que comprova os resultados histológicos que caracterizam o CGDH. De acordo com estes, sendo o CGDH um tipo de cancro gástrico difuso, as células perdem adesão em relação às demais, por ação da perda de expressão dos genes *CDH1* e/ou *CTNNA1*, o que potencia a migração das células tumorais para regiões externas ao epitélio gástrico.

Estes resultados vão ainda de encontro aos resultados obtidos por Carneiro *et al.* (por publicar) [51], em que foi usado um outro modelo matemático, o *phase-field model*, para descrever o comportamento do CGDH. Nestes resultados a célula tumoral perde adesão à restante estrutura e, por isso, ocorre a sua extrusão na direção da matriz extra-celular.

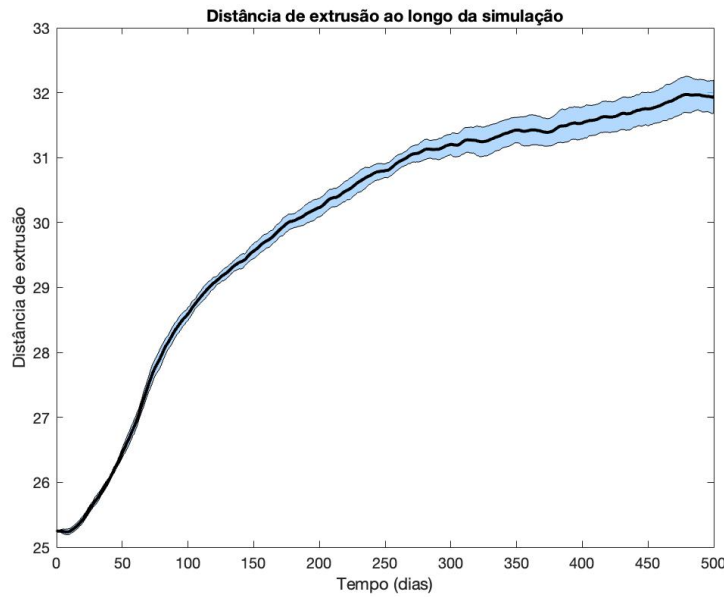


Figura 4.5: Evolução da distância de extrusão da célula tumoral ao longo da simulação. Os valores representados no gráfico correspondem a uma média aritmética de cinco simulações. A azul encontra-se representado o desvio padrão da média das cinco simulações.

Pela análise do gráfico da Figura 4.5 verifica-se que a distância de extrusão aumenta ao longo da simulação, o que é também comprovado pela Figura 4.4, onde é evidente o aumento da distância de extrusão ao longo do tempo. Salienta-se que a distância de extrusão corresponde à distância do centro de massa da célula tumoral ao centro da invaginação.

### 4.3 Avaliação do volume das células

De acordo com a Equação 3.4, o valor do volume alvo ( $V^T$ ) é garantido através do valor de  $\lambda^V$ ; a rigidez da célula obriga a que o volume das células tenda para o seu volume alvo, pelo que a diferença entre o volume da célula e o seu volume alvo não deverá ser significativa já que o valor de  $\lambda^V$  deverá assegurar que tal não aconteça. No gráfico da Figura 4.6 estão representados os volumes das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais) para diferentes valores de  $\lambda^V$  (2000, 2500, 3000, 3500, 4000 e 4500). Salienta-se que, neste caso, apenas foi alterado o valor de  $\lambda^V$  das células normais, mantendo-se o valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral ( $\lambda^V(CT) = 4500$ ).

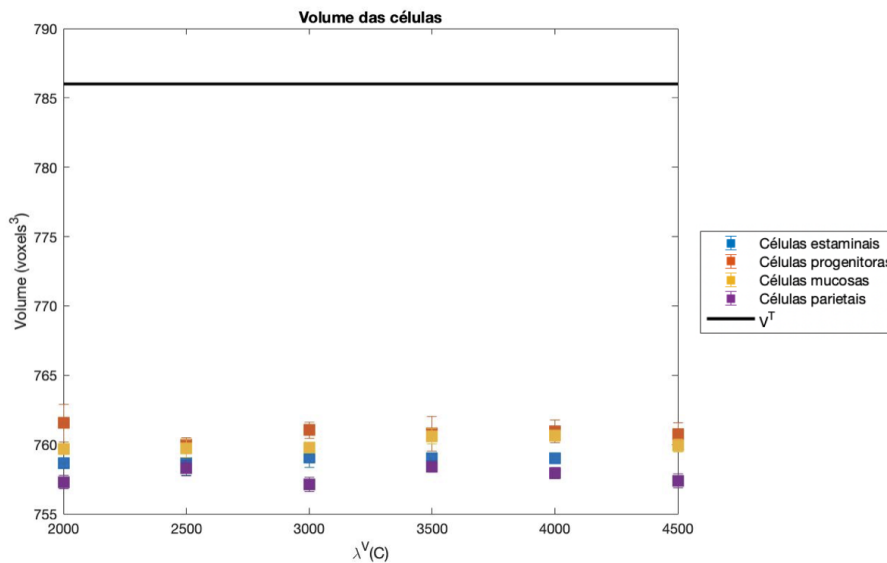


Figura 4.6: Volume médio das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais) ao fim de 500 PMC em função de diferentes valores de  $\lambda^V$ . A linha a preto representa o valor do volume alvo ( $V^T$ ) das células (786 voxels<sup>3</sup>).

De acordo com o gráfico da Figura 4.6 verifica-se que o aumento do valor de  $\lambda^V$  coincide a aproximação volume das células ao volume alvo, como seria de esperar pela Equação 3.4, no entanto, constata-se que as células nunca atingem exatamente o valor do volume alvo, apenas tendem para ele. Contudo, tendo em conta este comportamento, é de esperar que considerando valores de  $\lambda^V$  mais elevados o volume das células atinja o volume alvo. Porém, foi usado como condição inicial o valor de  $\lambda^V$  igual a 3000, para simular de uma forma mais realista o comportamento celular, (células mais flexíveis), mas também porque com este valor foi possível obter resultados genericamente melhores.

Na Figura 4.7 encontram-se as representações gráficas da evolução do volume das células ao longo do tempo de simulação, considerando as condições iniciais presentes nas Tabelas 4.2 e 4.3. Analisando o gráfico é possível verificar que, de um modo geral, o volume das células tende a diminuir ao longo do tempo de simulação. Porém, a variação entre o volume final e o volume inicial é residual comparativamente à ordem de grandeza dos valores, como seria de esperar. No caso da célula tumoral (gráfico da Figura 4.8), o volume decresce acentuadamente no início da simulação, aumentando posteriormente de forma rápida até estagnar mais ou menos a meio da simulação. Este comportamento é compatível com o que ocorre com a célula tumoral, nomeadamente na extrusão celular, isto é, o decréscimo do volume corresponde ao momento em que ocorre a extrusão. Esse decréscimo permite que a célula seja capaz de “abandonar” a estrutura em que se encontra circunscrita, procurando espaço para se desenvolver, o que se

torna propício ao seu aumento de volume, tal como é evidente no gráfico da Figura 4.8.

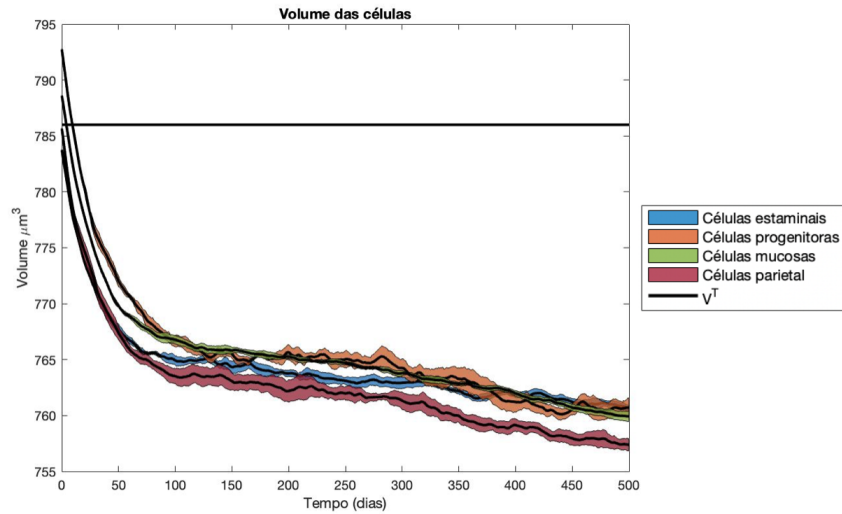


Figura 4.7: Evolução do volume das células ao longo da simulação. Os valores representados no gráfico correspondem a uma média aritmética de cinco simulações e ao respetivo desvio padrão. A linha a preto representa o volume alvo ( $V^T$ ) das células ( $786 \text{ voxels}^3$ ).

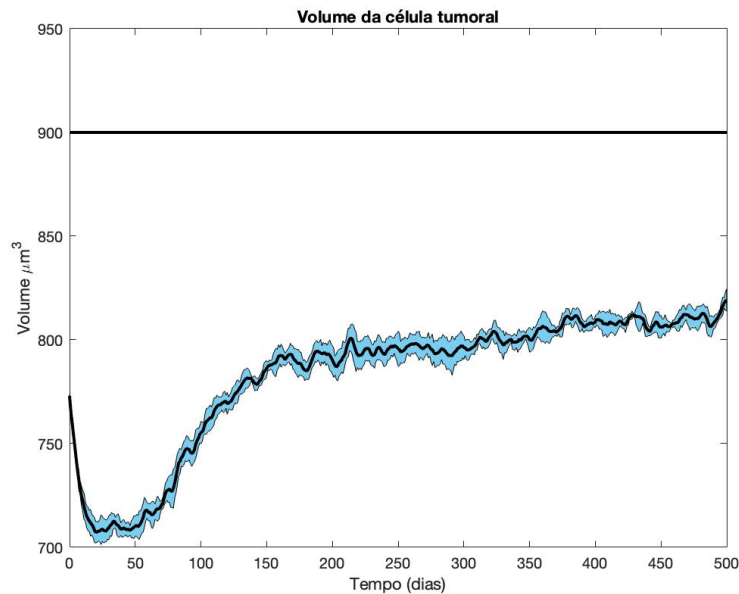


Figura 4.8: Evolução do volume da célula tumoral ao longo da simulação. Os valores representados no gráfico correspondem a uma média aritmética de cinco simulações e ao respetivo desvio padrão. A linha a preto representa o volume alvo ( $V^T$ ) da célula tumoral ( $900 \text{ voxels}^3$ ).



## 4.4 Influência da adesão das células

Para os estudos a seguir descritos foram considerados os parâmetros iniciais apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3, sendo que apenas foram alterados os valores de adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular ( $J_{TM}$ ) e entre a célula tumoral e as restantes células ( $J_{TC}$ ), considerando apenas uma única célula tumoral sem proliferação.

### 4.4.1 Influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular na distância de extrusão

De acordo com o descrito por Carneiro *et al.* (por publicar) [51], o valor de adesão entre o tumor e a matriz extra-celular afeta a distância de extrusão da célula tumoral, ou seja, o aumento da adesão entre a célula tumoral e a MEC facilita a extrusão celular. Para avaliar esta premissa foram realizados cinco testes para cada valor de adesão considerado: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3. De notar que estes valores correspondem ao valor do parâmetro  $J$  no Hamiltoniano (Equação 3.2), o que significa que um maior valor de  $J$  corresponde a uma menor adesão, ou seja, a maior adesão entre a célula tumoral e a MEC corresponde ao valor de  $J$  de 0,5 e, por sua vez, o menor valor de adesão corresponde ao valor de  $J$  de 3.

Os gráficos que estabelecem a relação entre a distância de extrusão da célula tumoral e a sua adesão à MEC estão representados nas Figuras 4.9 e 4.8. Realça-se que os valores da distância de extrusão apresentados dizem respeito à média aritmética dos valores obtidos em cinco simulações para cada valor de adesão, sendo igualmente representado o correspondente desvio padrão da média.

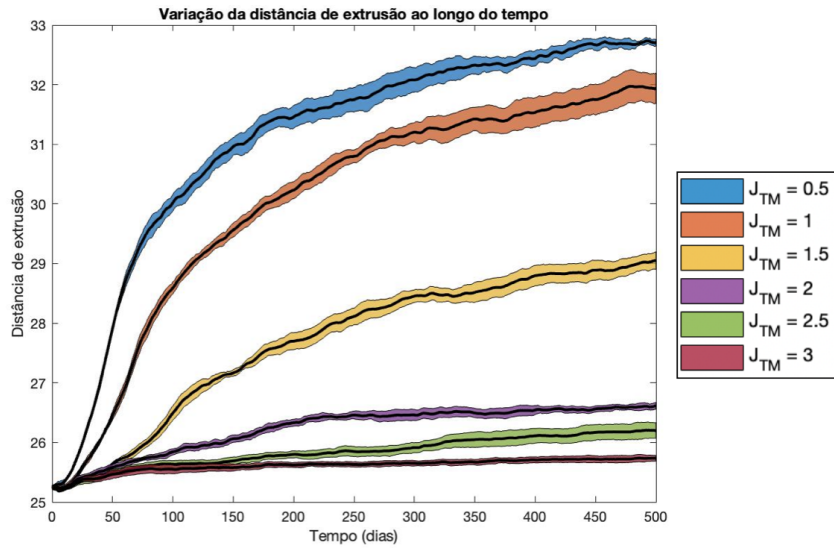


Figura 4.9: Variação da distância de extrusão ao longo do tempo para os diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e a matriz extra-celular ( $M$ ).

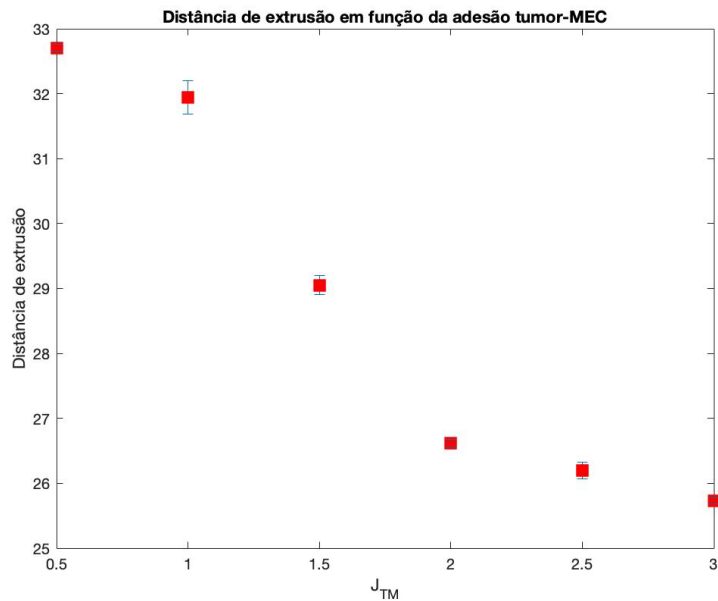


Figura 4.10: Relação entre a distância de extrusão da célula tumoral e a adesão da mesma à matriz extra-celular ao fim de 500 PMC. Os pontos representados a vermelho, correspondem aos valores médios da distância de extrusão para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas.

Comparando o gráfico da Figura 4.9 com o gráfico da Figura 4.5 verifica-se que o comportamento dos valores da distância ao longo da simulação é semelhante, principalmente para os primeiros quatro valores de  $J$  (0,5; 1; 1,5 e 2), ou seja, inicialmente a distância de extrusão aumenta rapidamente, nestes casos, e nos restantes dois ( $J$  igual a 2,5 e 3) este aumento não é

tão evidente.

No gráfico da Figura 4.9 é patente que quanto menor for o valor de  $J$  (0,5, no caso), maior a distância de extrusão, sendo que à medida que esse valor aumenta a distância de extrusão diminui ou seja, aumentando a adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular a distância de extrusão é também ela maior, o que é corroborado pelo gráfico da Figura 4.10 onde apenas são consideradas as distâncias de extrusão no final da simulação para cada valor de  $J$ , comprovando assim o estudo apresentado por Carneiro *et al.* (por publicar) [51]. A elevada adesão da célula tumoral à matriz ajuda-a a abandonar a estrutura cilíndrica e a migrar para a região da matriz. Estes resultados podem ainda ser considerados como mais favoráveis visto que a estrutura usada é cilíndrica, o que de acordo com Carneiro *et al.* (por publicar) [51] facilita a extrusão celular devido à maior área de contacto entre as células do epitélio e a matriz extra-celular. De realçar que para valores de  $J$  superiores a 1,5, a variação da distância de extrusão é residual. Nestes casos pode até considerar-se que a célula não abandona as demais, ou seja, não migra para a matriz, o que implica que não ocorra extrusão celular, como se constata nos cortes transversais referentes a cada teste com diferentes valores de adesão representados na Figura 4.11. Nestes é evidente que para valores de  $J$  superiores a 1,5 não ocorre extrusão celular, sendo os resultados semelhantes para os restantes valores de  $J$ .

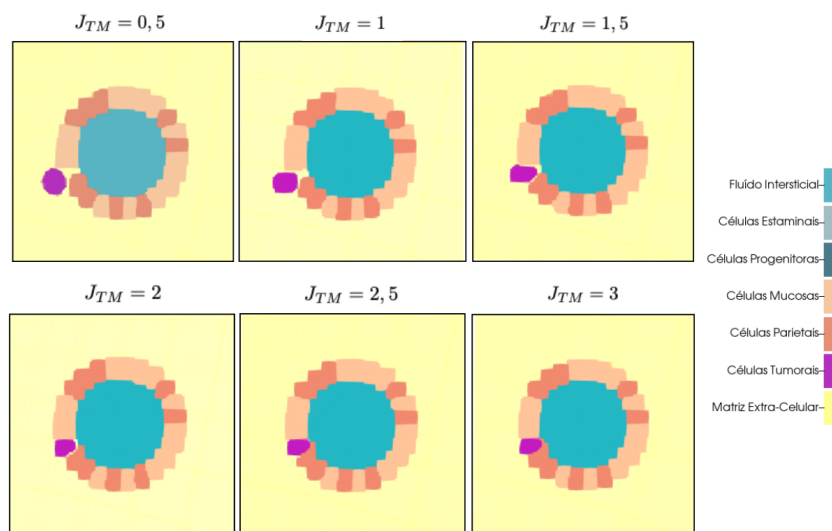


Figura 4.11: Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço no final da simulação (500 PMC), para diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e a matriz extra-celular ( $M$ ).

Salienta-se que apesar de os melhores resultados de extrusão ocorrerem para  $J_{TM} = 0,5$ , o valor de  $J$  entre a célula tumoral e a matriz extra-celular utilizado nas condições iniciais é 1,

para que a diferença entre os vários valores de  $J$  não fosse excessiva, e para assim obter melhores resultados em termos gerais.

#### 4.4.2 Influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular no volume da célula tumoral

Para este estudo realizaram-se seis testes para diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e a matriz extra-celular ( $M$ ): 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3. Em cada um destes testes foram feitas cinco simulações, estando o resultado representado no gráfico da Figura 4.12.

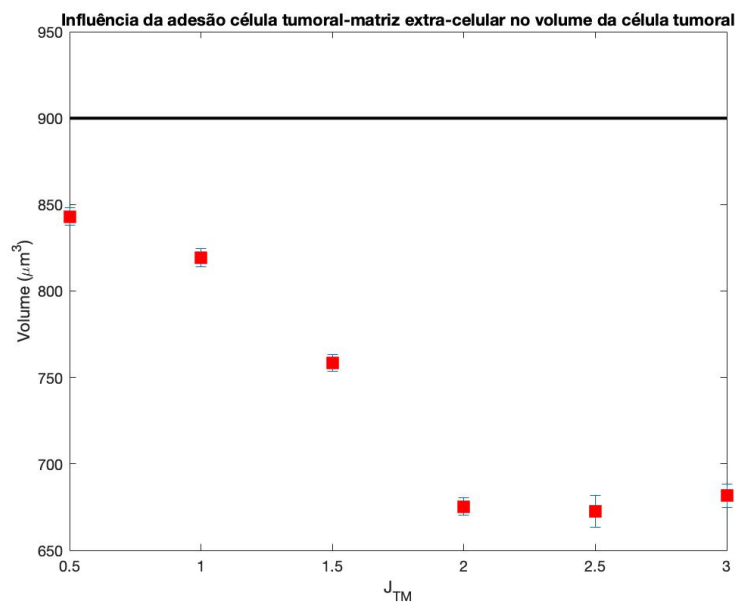


Figura 4.12: Relação entre a adesão da célula tumoral à matriz extra-celular representada pelo valor de  $J_{TM}$  e o volume da célula tumoral ao fim de 500 PMC. Os pontos representados a vermelho, correspondem aos valores médios do volume da célula tumoral para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas. A linha a preto representa o volume alvo da célula tumoral (900 voxels<sup>3</sup>).

No gráfico da Figura 4.12 verifica-se que quanto menor for a adesão do tumor à matriz (maior valor de  $J$ ), menor é o seu volume. De relembrar que para menores valores de adesão tumor-MEC, menor é a distância de extrusão da célula, ou seja, mais confinada fica a célula tumoral à sua estrutura inicial, isto faz com que não se consiga expandir ou migrar, e daí que o seu volume diminua comparativamente a outros valores de  $J$  superiores. A esses valores corresponde uma maior capacidade de extrusão da célula e, por isso, maior liberdade e mais espaço para a célula crescer, o que potencia o aumento do seu volume. Estes resultados vão ainda de encontro aos cortes transversais do modelo representados na Figura 4.11, onde é possível verificar que para

$J_{TM} = 0,5$  e  $J_{TM} = 1$ , o volume da célula tumoral é maior, quando comparado com os restantes valores de  $J$ .

Relativamente ao volume das restantes células (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais), este mantém-se aproximadamente constante com variações muito reduzidas e quase insignificantes quando considerado o desvio padrão das cinco simulações. Estes resultados são comprovados pelos gráficos da Figura 4.13, onde está representada a variação do volume médio final de cinco simulações para cada valor de  $J$ , bem como o respetivo desvio padrão e o volume alvo das célula.

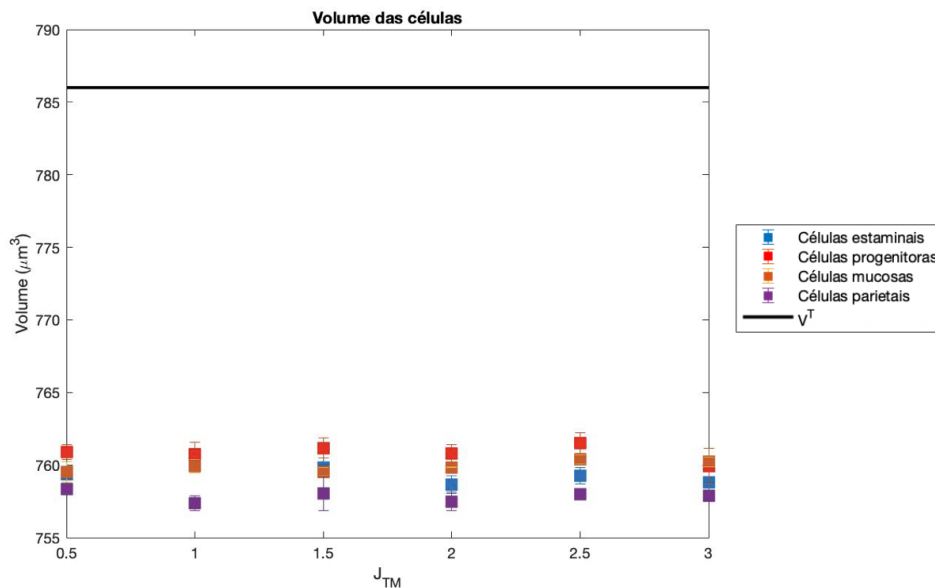


Figura 4.13: Relação entre a adesão da célula tumoral à matriz extra-celular e o volume das células estaminais, progenitoras, mucosas e parietais no fim de 500 PMC. Os pontos representados correspondem aos valores médios do volume para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas. A linha a preto representa o volume alvo das células ( $786 \text{ voxels}^3$ ).

#### 4.4.3 Influência da adesão entre a célula tumoral e as restantes células na distância de extrusão

De acordo com o modelo desenvolvido e descrito ao longo da presente dissertação, numa invaginação a célula tumoral ocupa o lugar de uma célula parietal na região superior do pescoço, na fronteira com o istmo, pelo que se encontra rodeada por células de quatro tipos diferentes: células estaminais, progenitoras, mucosas e parietais. No estudo a seguir apresentado foi avaliada a influência da adesão da célula tumoral às restantes células que a envolvem. Nesse sentido, é expectável que quanto menor for a adesão da célula tumoral, menos “presa” esta está às demais

células, logo espera-se que a sua capacidade invasiva seja maior, pelo que a distância de extrusão deve também ela ser maior com a diminuição da adesão entre a célula tumoral e as restantes.

Para averiguar esta premissa realizaram-se simulações com diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e as restantes células ( $C$ ), entre 1 e 9. Para cada caso, foram feitas cinco simulações e, posteriormente, determinada a sua média aritmética, bem como o respetivo desvio padrão. Os resultados deste estudo encontram-se representados no gráfico da Figura 4.14.

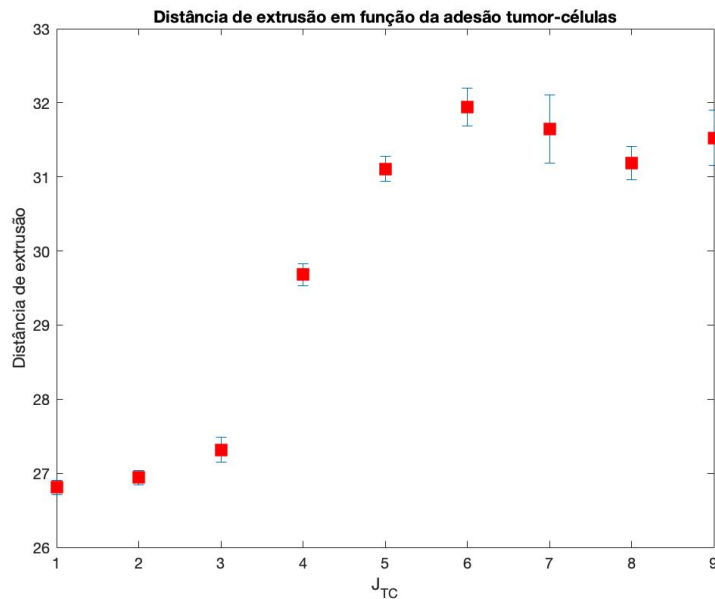


Figura 4.14: Relação entre a distância de extrusão da célula tumoral e a adesão da mesma às restantes células que a envolvem ( $J_{TC}$ ) ao fim de 500 PMC. Os pontos representados correspondem aos valores médios da distância de extrusão para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas.

O gráfico da Figura 4.14 evidencia que quanto menor for a adesão da célula tumoral às restantes células, isto é, quanto maior for o valor de  $J_{TC}$  no Hamiltoniano, maior é a distância de extrusão da célula tumoral. Isto vai de encontro ao perspetivado: com menor adesão às células que rodeiam a célula tumoral, maior será a sua capacidade de invadir a matriz extra-celular. A exceção a esta tendência ocorre quando  $J$  toma os valores de 7 e 8; no entanto, considerando os respetivos desvios padrão, verifica-se que as alterações não são significativas, logo não afetam as conclusões obtidas nos restantes pontos.

Salienta-se ainda que o valor de  $J$  entre a célula tumoral e as restantes células considerado para as condições iniciais do modelo foi de 6, por ser aquele com que se obtém melhores resultados de extrusão celular, mas também de volume das células, o que será comprovado mais à frente.

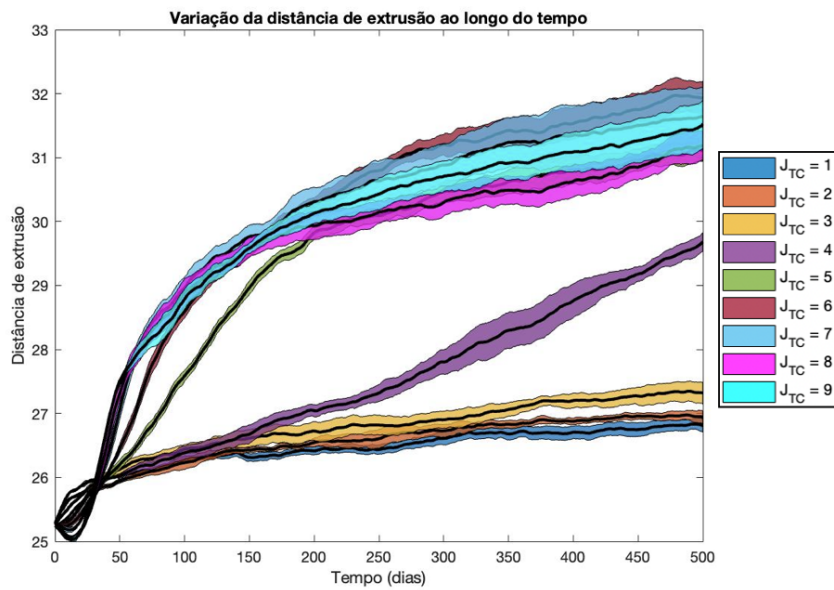


Figura 4.15: Variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e as restantes células ( $C$ ).

No gráfico da Figura 4.15 estão representadas as curvas referentes à variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os diferentes valores de  $J$  considerados. Verifica-se que, à semelhança dos resultados da análise da influência da adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular (gráfico da Figura 4.9), também neste caso a distância de extrusão aumenta muito rapidamente nos momentos iniciais, o que se observa para valores de  $J$  elevados (superiores a 5) corroborando o apresentado no gráfico da Figura 4.14. Nos restantes casos a distância de extrusão é muito reduzida, pelo que se pode considerar que nem ocorre, já que a variação desta ao longo da simulação é quase insignificante. Os cortes transversais do modelo no fim da simulação, representados na Figura 4.16, confirmam estes resultados, isto é, para valores de  $J$  inferiores a 4, não ocorre extrusão celular, e esta apenas se torna evidente a partir de  $J_{TC} = 4$ , apesar da extrusão ser ainda reduzida.

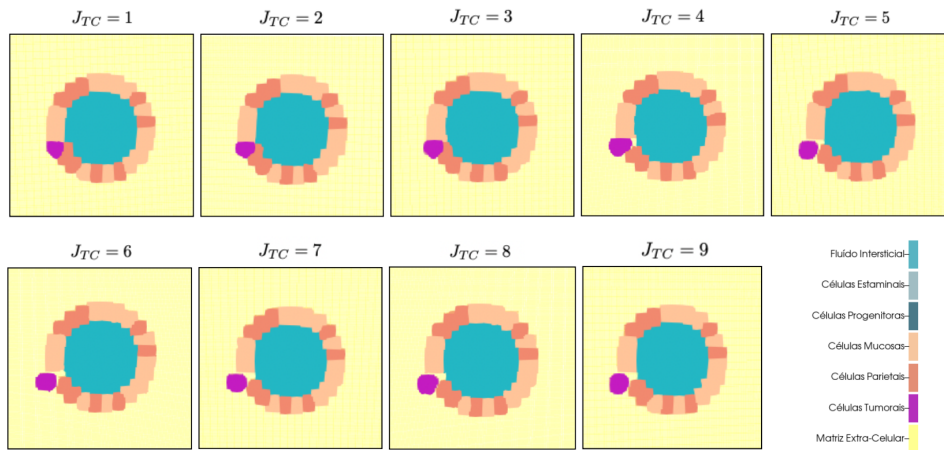


Figura 4.16: Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço no final da simulação, para diferentes valores de  $J$  entre a célula tumoral ( $T$ ) e as restantes células ( $C$ ).

Nos vários cortes transversais da Figura 4.16 observa-se que a forma da célula tumoral se altera conforme a maior ou menor extrusão celular, sendo que para valores de  $J$  superiores a 5 a célula tumoral se torna cada vez mais esférica. Esta alteração da forma da célula será discutida mais à frente no presente capítulo.

#### 4.4.4 Influência da adesão entre a célula tumoral e as restantes células no volume da célula tumoral

Tendo em conta o já discutido nas secções anteriores, perspectiva-se que o volume da célula tumoral seja maior para valores de adesão entre esta e as restantes que potenciem a extrusão da célula, pelo que, o volume da célula tumoral deverá ser maior para uma menor adesão (maior valor de  $J$ ). No gráfico da Figura 4.17 encontra-se representada a relação entre o volume da célula tumoral e o valor de  $J_{TC}$ .



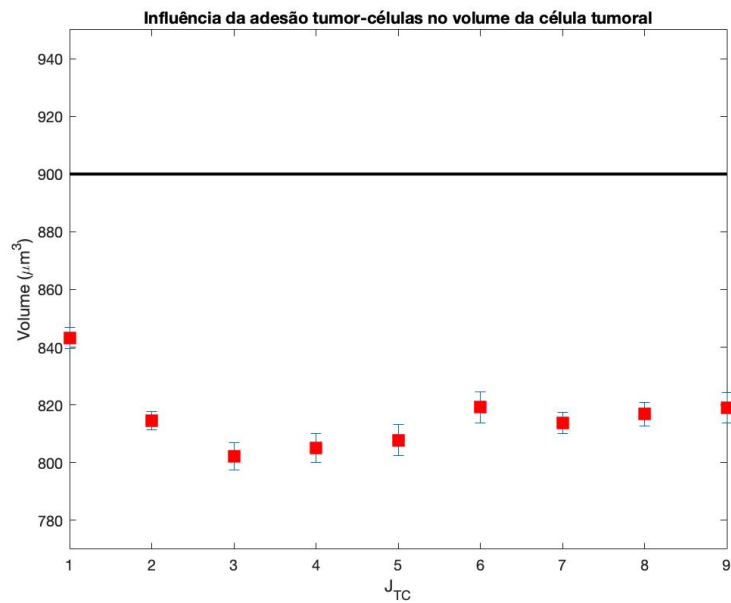


Figura 4.17: Relação entre o volume da célula tumoral e a adesão da mesma às restantes células que a envolvem ( $J_{TC}$ ) ao fim de 500 PMC. Os pontos representados a vermelho, correspondem aos valores médios do volume para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas. A linha a preto representa o volume alvo da célula tumoral (900 voxels<sup>3</sup>).

De acordo com o gráfico da Figura 4.17, o maior volume da célula tumoral no fim da simulação coincide com uma maior adesão às restantes células, sendo que à medida que o valor de  $J$  aumenta, ou seja, quando a adesão diminui, o volume da célula tumoral tende a diminuir também até  $J_{TC} = 3$ . A partir deste valor, o volume aumenta ligeiramente atingindo um novo pico de volume para  $J_{TC} = 6$ . Para valores de  $J$  superiores, o volume varia ligeiramente; porém, quando são considerados os respetivos desvios padrão e os valores do volume, pode verificar-se que as variações deste são residuais. Para uma menor adesão, nomeadamente para  $J_{TC} = 6$ , há uma maior distância de extrusão (Figuras 4.14, 4.15 e 4.16), e um maior volume da célula tumoral, o que vai de encontro ao inicialmente previsto. Relativamente ao resultado associado a  $J_{TC} = 1$ , este pode ser explicado pelo facto de que, com uma maior adesão da célula tumoral às restantes, esta é capaz de manter a sua forma inicial. Isto traduz-se numa manutenção do seu volume, o que não acontece nos casos em que a adesão se começa a perder (maiores valores de  $J$ ), e, por isso, a célula torna-se menos agarrada à sua estrutura inicial. Isto vai permitir que a sua forma se altere, facilitando a extrusão, o que é acompanhado por uma variação de volume. No entanto, quando a extrusão é maior a célula tem mais espaço para alterar a sua morfologia, daí o aumento de volume para  $J_{TC} = 6$ . Estes resultados são ainda comprovados pelos cortes transversais do modelo representados na Figura 4.16.

## 4.5 Influência da rigidez das células tumorais

Para os seguintes estudos apresentados foram considerados os parâmetros iniciais presentes nas Tabelas 4.2 e 4.3, alterando apenas o valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral, e considerando sete valores distintos: 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 e 5000. Este parâmetro, tal como descrito na Secção 3.1.1, pode ser considerado como uma medida da rigidez das células.

À semelhança dos estudos anteriores, apenas foi considerada uma célula tumoral sem proliferação.

### 4.5.1 Influência da rigidez das células tumorais na sua distância de extrusão

O resultado do estudo da influência da rigidez das células tumorais na sua distância de extrusão está representado no gráfico da Figura 4.18, onde se encontra representada a relação entre o valor de  $\lambda^V$  e a distância de extrusão da célula tumoral.

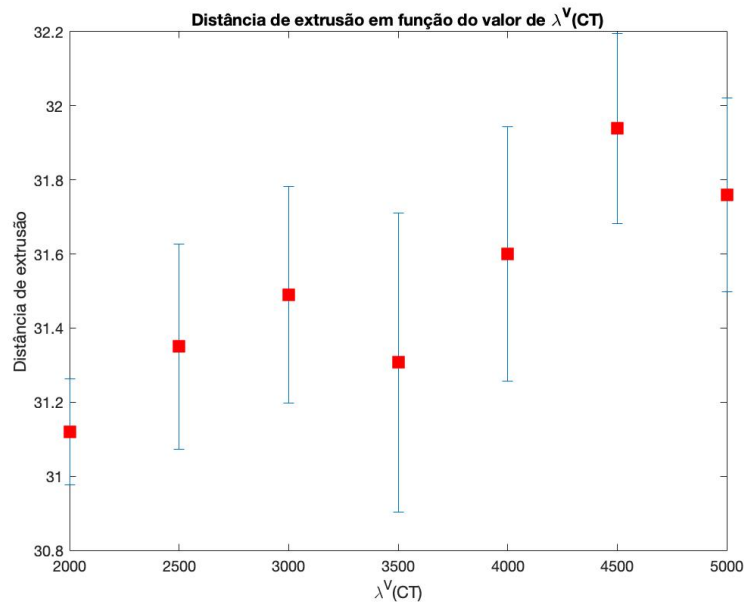


Figura 4.18: Relação entre a rigidez da célula tumoral ( $\lambda^V(CT)$ ) e a sua distância de extrusão ao fim de 500 PMC. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas.

Observando os valores da distância de extrusão na Figura 4.18 e os respetivos desvios padrão associados a cada medição para os diferentes valores de  $\lambda^V$ , é possível verificar que a variação da distância é muito reduzida. Pode então considerar-se que o valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral, ou seja, a sua rigidez, não influencia a sua extrusão. Estes resultados são compatíveis com a influência do parâmetro  $\lambda^V$  no modelo, visto que está associado ao volume das células e não à

adesão entre as mesmas. Logo, tendo em conta as equações do Hamiltoniano que descrevem o modelo, o valor de  $\lambda^V$  não deve influenciar significativamente a extrusão da célula, tal como fica provado pelos gráficos das Figuras 4.18 e 4.19. No gráfico da Figura 4.19, onde está representada a variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os sete valores de  $\lambda^V$ , é evidente que este parâmetro não tem influência significativa na extrusão da célula tumoral, verificando-se que o comportamento da distância de extrusão ao longo da simulação é semelhante em todos os casos considerados.

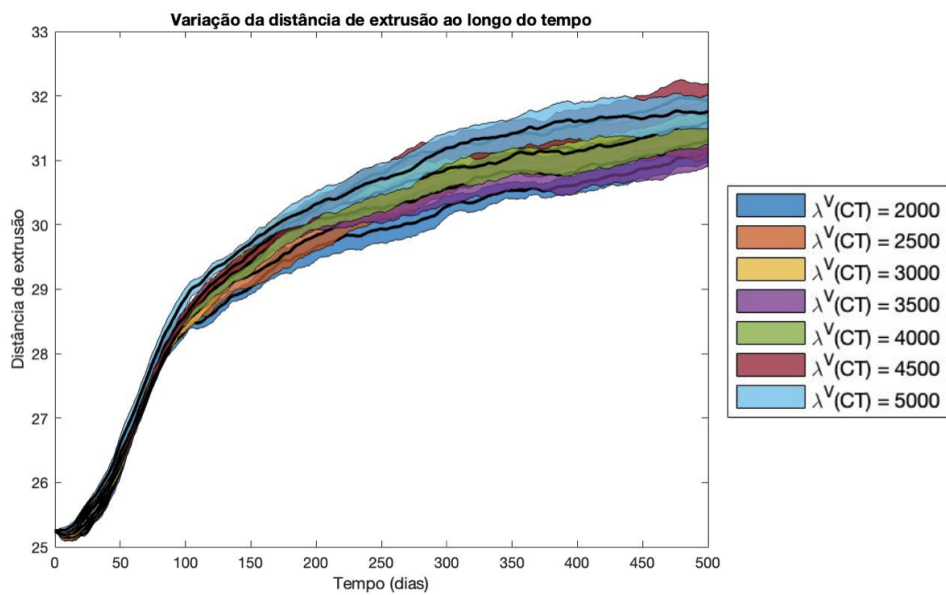


Figura 4.19: Variação da distância de extrusão ao longo da simulação para os diferentes valores de  $\lambda^V$  da célula tumoral ( $CT$ ) ao fim de 500 PMC.

Na Figura 4.20 estão representados alguns cortes transversais do modelo que corroboram o já referido: a extrusão celular da célula tumoral não é afetada significativamente pelo valor de  $\lambda^V$ , visto que em todos os casos ocorre extrusão.

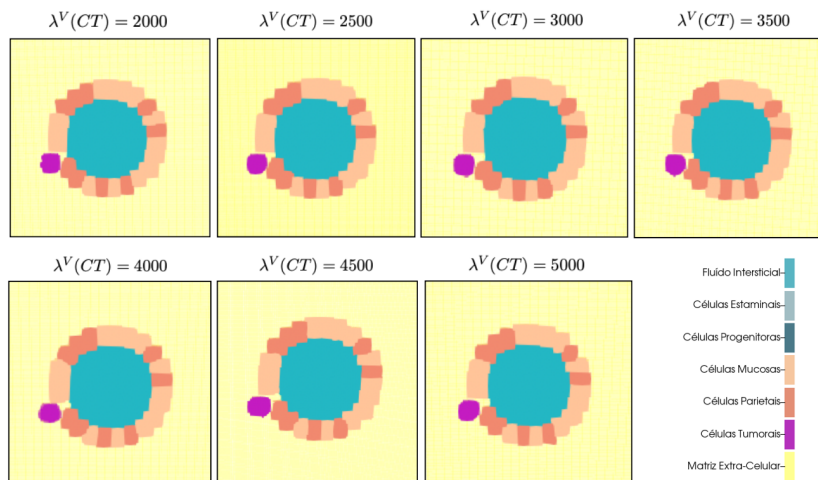


Figura 4.20: Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço no final da simulação, para diferentes valores de  $\lambda^V$  da célula tumoral  $\lambda^V(CT)$ .

#### 4.5.2 Influência da rigidez das células tumorais no volume das mesmas

De acordo com o descrito na Secção 3.1.1 e apresentado na Equação 3.4, o valor de  $\lambda^V$  relaciona-se com o volume da célula, sendo que quanto maior for o seu valor, mais próximo deverá ser o volume da célula do seu valor alvo. Para avaliar esta relação foram feitos sete testes com cinco simulações cada, para diferentes valores de  $\lambda^V$  da célula tumoral. Estes tentaram abranger o intervalo de valores que compreende os valores escolhidos como condições iniciais do modelo, tanto para o caso das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais), como para as células tumorais. Esses valores foram já mencionados anteriormente. No gráfico da Figura 4.21 encontra-se representado o resultado deste estudo.

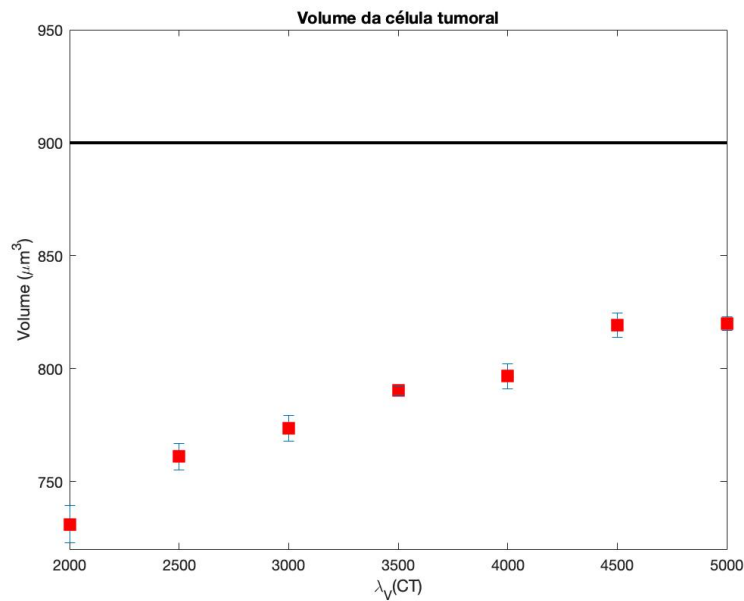


Figura 4.21: Relação entre o valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral ( $\lambda^V(CT)$ ) e o seu respetivo volume. Os pontos representados a vermelho correspondem aos valores médios da distância de extrusão para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas. A linha a preto representa o volume alvo da célula tumoral ( $900 \text{ voxels}^3$ ).

A partir do gráfico da Figura 4.21 constata-se que ao aumento do valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral corresponde um aumento do volume da célula aproximando-se do valor do volume alvo, o que vai de encontro ao que seria expectável na análise da Equação 3.4. Salienta-se que o volume apresentado corresponde ao volume da célula no final da simulação; desta forma o valor de  $\lambda^V$  considerado como valor padrão para as condições iniciais é adequado, pois permite obter bons resultados referentes ao volume da célula tumoral.

Relativamente ao volume das restantes células, este não sofre grandes variações com os diferentes valores de  $\lambda^V$  considerados, o que faz sentido, visto que apenas é alterado o valor do  $\lambda^V$  da célula tumoral e o valor para as restantes células é mantido constante, logo estas alterações não devem ter implicação no volume das células normais. Isto é comprovado no gráfico da Figura 4.22, onde apesar de os valores não serem constantes, se pode concluir que as variações de volume são muito reduzidas, dentro dos respetivos desvios padrão.

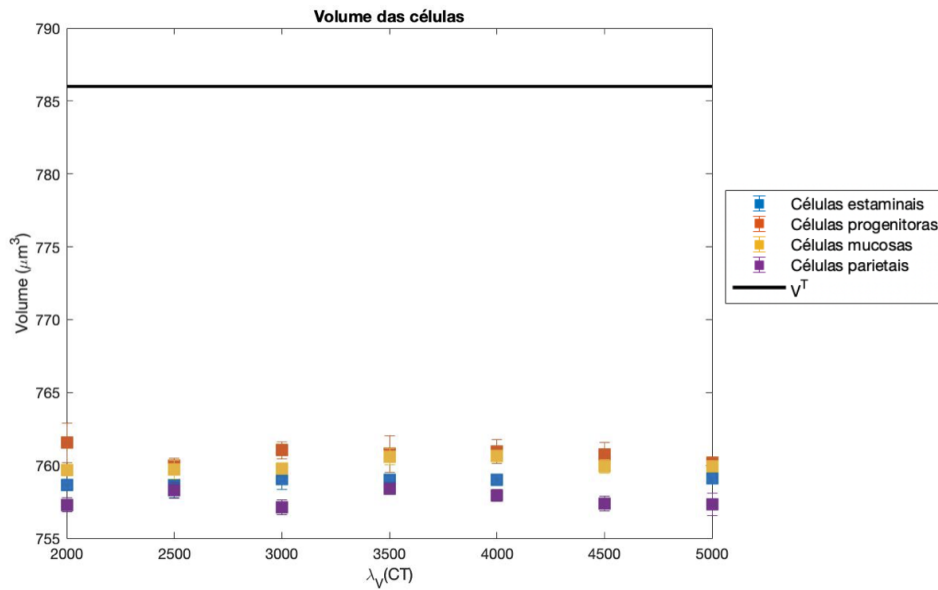


Figura 4.22: Relação entre o valor de  $\lambda^V$  da célula tumoral ( $CT$ ) e o volume das células normais (estaminais, progenitoras, mucosas e parietais). Os pontos representados, correspondem aos valores médios do volume da célula para cada valor de adesão. Associado a cada ponto está representado o respetivo desvio padrão correspondente à média das cinco simulações realizadas. A linha a preto representa o volume alvo das células ( $786 \text{ voxels}^3$ ).

## 4.6 Proliferação tumoral

Na Secção 3.3.1 é referido que a proliferação celular é exclusiva das células tumorais, sendo que uma célula dá origem a duas, num processo aleatório de mitose que ocorre de forma simétrica e cuja duração corresponde à duração média de um ciclo celular de 24 dias e desvio padrão de 3 dias, seguindo uma distribuição Gaussiana. Todavia este processo só ocorre se o volume da célula tumoral for superior a 5% do seu volume alvo e se o tempo de proliferação for superior ao seu tempo limite, definido por uma distribuição Gaussiana de média 24 e desvio padrão de 3. Após a divisão celular, por mitose, cada célula tumoral resultante fica com o volume alvo inicial e o tempo de proliferação é colocado a zero, iniciando-se uma nova contagem temporal com o início de um novo processo de proliferação.

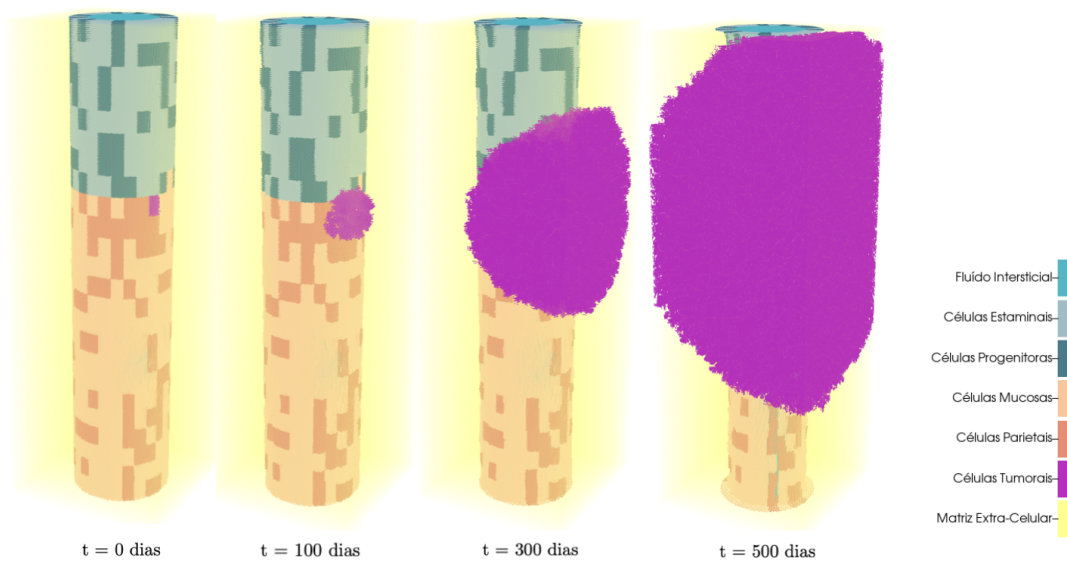


Figura 4.23: Evolução da proliferação tumoral ao longo do tempo.

Na Figura 4.23 encontra-se representada a evolução do modelo ao longo do tempo quando é considerada a proliferação tumoral. Nestas representações observa-se um aumento elevado do volume do tumor, uma vez que no teste realizado para a obtenção destes resultados não foi considerado nenhum tipo de limite à proliferação, para além dos já referidos anteriormente. É ainda de notar que no fim da simulação, ao fim de 500 dias, o tumor apresenta dimensões tão elevadas que fazem contrair as restantes células, mas mantendo-se confinado ao domínio usado no modelo. Isto é explicado pela necessidade de espaço para o tumor proliferar e pela pressão exercida pelas células tumorais nas restantes. Na Figura 4.24 estão representados cortes transversais do modelo ao longo da simulação correspondentes ao mesmo número de dias das representações da Figura 4.23. Nestes cortes apenas está representada a estrutura cilíndrica na ausência do tumor e da matriz extra-celular, para permitir uma melhor visualização, sendo possível observar que à medida que o tumor se desenvolve, as células vizinhas vão perdendo a sua forma inicial, pelo que a integridade da invaginação não é mantida com o desenvolvimento tumoral.

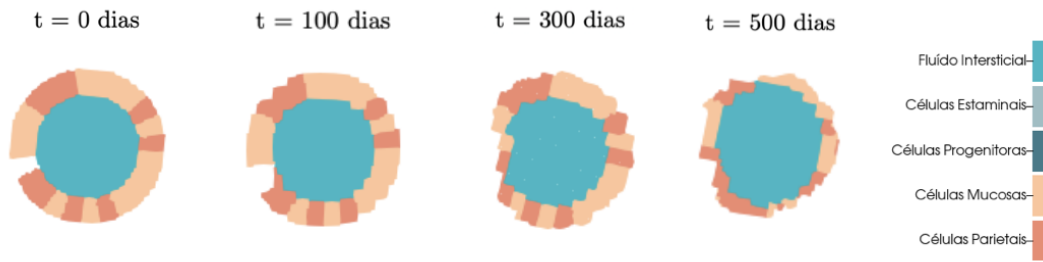


Figura 4.24: Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço ao longo do tempo.

#### 4.6.1 Influência da duração do ciclo celular

Como já referido, apenas as células tumorais têm capacidade proliferativa, considerando a duração média do ciclo celular de 24 dias.

É expectável que aumentando a duração do ciclo celular, a taxa de proliferação das células diminua, e consequentemente também diminua o desenvolvimento tumoral, que se reflete numa diminuição do volume do tumor. Assim, para avaliar a influência da taxa de proliferação no desenvolvimento do tumor, realizaram-se três testes com cinco simulações cada para três valores distintos da duração de um ciclo celular típico: 24 dias, 36 dias e 48 dias. Os resultados destes testes estão representados no gráfico da Figura 4.25.

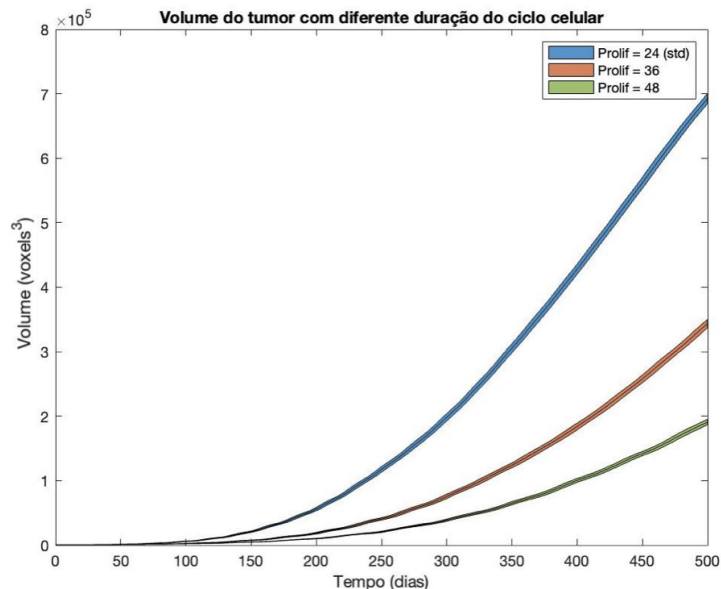


Figura 4.25: Volume do tumor com diferente duração do ciclo celular (24, 36 e 48 dias) e consequentemente diferente taxa de proliferação.

De acordo com o gráfico da Figura 4.25, verifica-se que aumentando a duração do ciclo celular



o volume do tumor diminui, o que vai de encontro ao esperado: com o aumento da duração do ciclo celular, as células demorarão mais tempo até à mitose, o que atrasa a sua proliferação e consequentemente o seu desenvolvimento e se traduz numa diminuição do volume do tumor. Estas conclusões podem ainda ser comprovadas pelos cortes transversais do modelo ao longo do tempo para os três valores de proliferação considerados, apresentados na Figura 4.26.

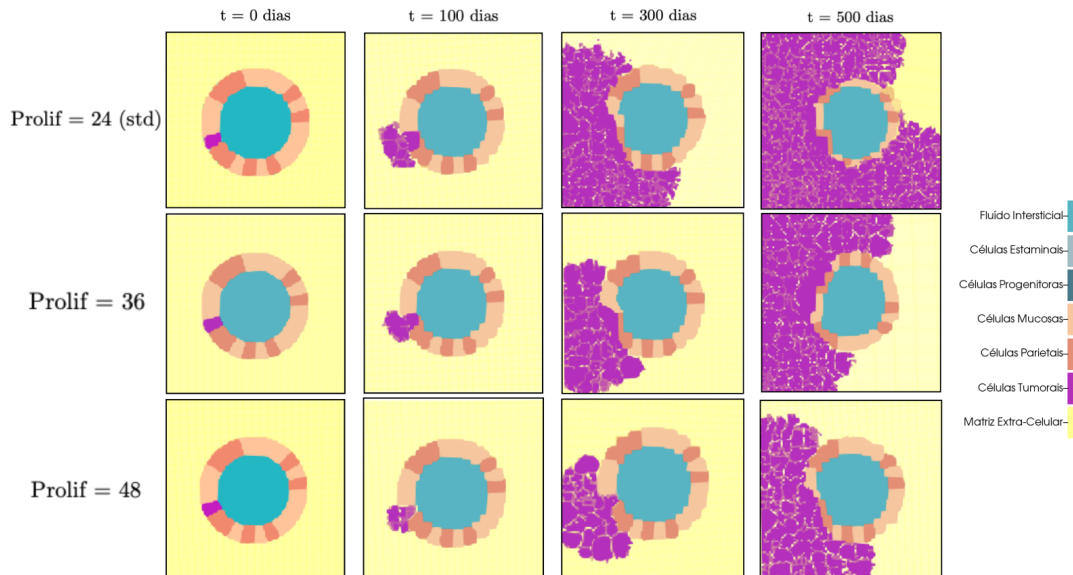


Figura 4.26: Representação de cortes transversais do modelo na região superior do pescoço ao longo do tempo, para diferentes valores de duração do ciclo celular, e consequentemente de proliferação (24, 36 e 48 dias).

Analisando os vários cortes transversais é evidente que o aumento da duração do ciclo celular conduz a um atraso no desenvolvimento do tumor e, consequentemente, a uma diminuição do seu volume; desta forma, os resultados vão de encontro ao esperado.

#### 4.6.2 Forma das células tumorais

Para avaliar a evolução da forma das células tumorais com proliferação, limitou-se o seu número máximo (16 células), para facilitar a visualização da sua morfologia.

De acordo com o descrito na literatura e na Secção 2.3.1, histologicamente o CGDH caracteriza-se pela presença de lesões em forma de anel de sinete, ou seja, nos cortes histológicos são visíveis estruturas aproximadamente circulares, não coesas e dispersas, como se observa na Figura 4.27. Assim, é de esperar que a forma das células tumorais do modelo mimetize os cortes histológicos.

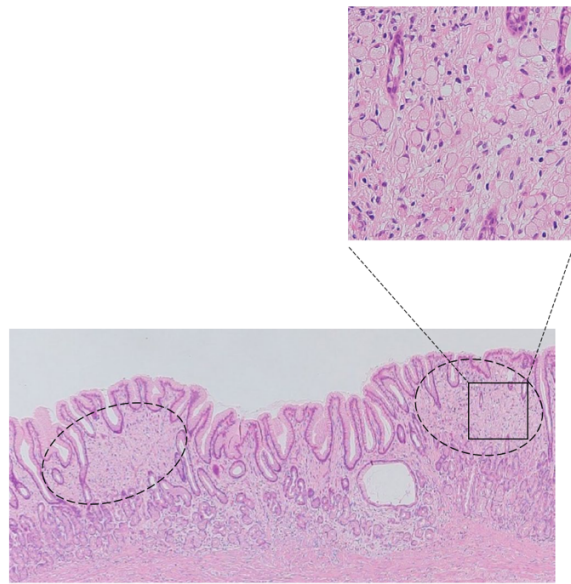


Figura 4.27: Imagem histológica do epitélio do estômago e das estruturas em anel de sinete típicas do CGDH.

Adaptada de [50].

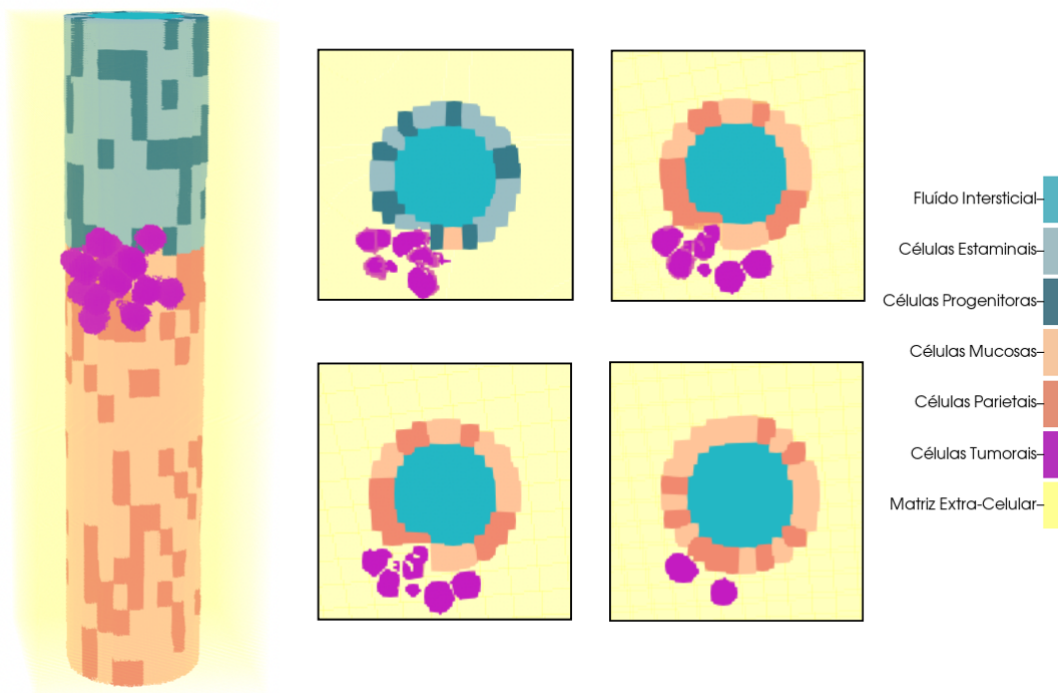


Figura 4.28: Representação do modelo com proliferação tumoral controlada e cortes transversais de várias regiões do tumor ao fim de 500 PMC.

Analisando a Figura 4.28 verifica-se que a forma das células tumorais é aproximadamente esférica, formando um tumor com células dispersas e não aglomeradas. Atendendo aos vários cortes transversais realizados em diferentes regiões do tumor, observa-se que, na generalidade,

as células são circulares e independentes das restantes, o que vai de encontro ao apresentado na Figura 4.27, pelos cortes histológicos.

Para comprovar que a forma das células tumorais que compõem o tumor é aproximadamente esférica, foi calculada a razão (Equação 4.1) entre a média do momento de inércia das células tumorais (Equação 4.2) e o momento de inércia de uma esfera (Equação 4.3).

$$R_{MI} = \frac{I_{tumor}}{I_{esfera}} \quad (4.1)$$

$$I_{tumor} = \sum_i m_i d_i^2 = \sum_i V_i d_i^2 \quad (4.2)$$

$$I_{esfera} = \frac{2}{5} m r^2 = \frac{2}{5} m \left( \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}} \right)^2 \quad (4.3)$$

O tensor de inércia de um determinado objeto depende da sua distribuição de massa, o que permite comparar o momento de inércia de uma esfera com o momento de inércia de um tumor com a mesma massa e volume. Assim, a razão  $R_{MI}$  permite identificar quão próxima é a forma das células tumorais em relação a uma esfera.

Para determinar o momento de inércia das células tumorais começou-se por calcular o centro de massa de cada célula e, posteriormente, a distância de cada voxel da célula ao eixo dos  $zz$  que passa pelo centro de massa. Por fim procedeu-se ao cálculo da média do momento de inércia das células tumorais. De referir que se considerou uma densidade constante de 1 para facilitar os cálculos, pelo que a massa da célula iguala o volume da mesma.

Para este estudo realizaram-se novamente cinco testes, estando o seu resultado representado na Figura 4.29.

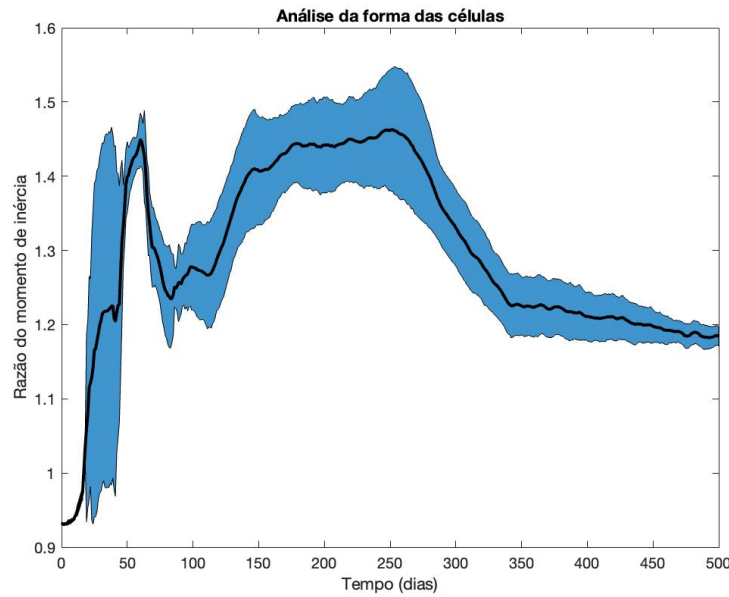


Figura 4.29: Razão entre o momento de inércia médio das células tumorais ( $I_{tumor}$ ) e o momento de inércia de uma esfera ( $I_{esfera}$ ) com a mesma massa.

Observando o gráfico da Figura 4.29 verifica-se que no início da simulação a forma das células é muito variável, o que corresponde ao início da extrusão celular, que se caracteriza por uma adaptação da morfologia das células para que estas sejam capazes de abandonar a estrutura da invaginação. Ao fim de 350 dias a razão  $R_{MI}$  começa a estabilizar, ou seja, a forma da célula torna-se aproximadamente constante até ao fim da simulação, sendo o valor de  $R_{MI}$  próximo de 1. Isto comprova que as células são aproximadamente esféricas, no entanto, constata-se que  $R_{MI}$  nunca atinge o valor 1, o que pode ser explicado pelas flutuações numéricas introduzidas pelo cálculo da média do momento de inércia das células tumorais e pelo facto de nem todas as células serem exatamente esféricas, como se pode observar nos cortes transversais representados na Figura 4.30.

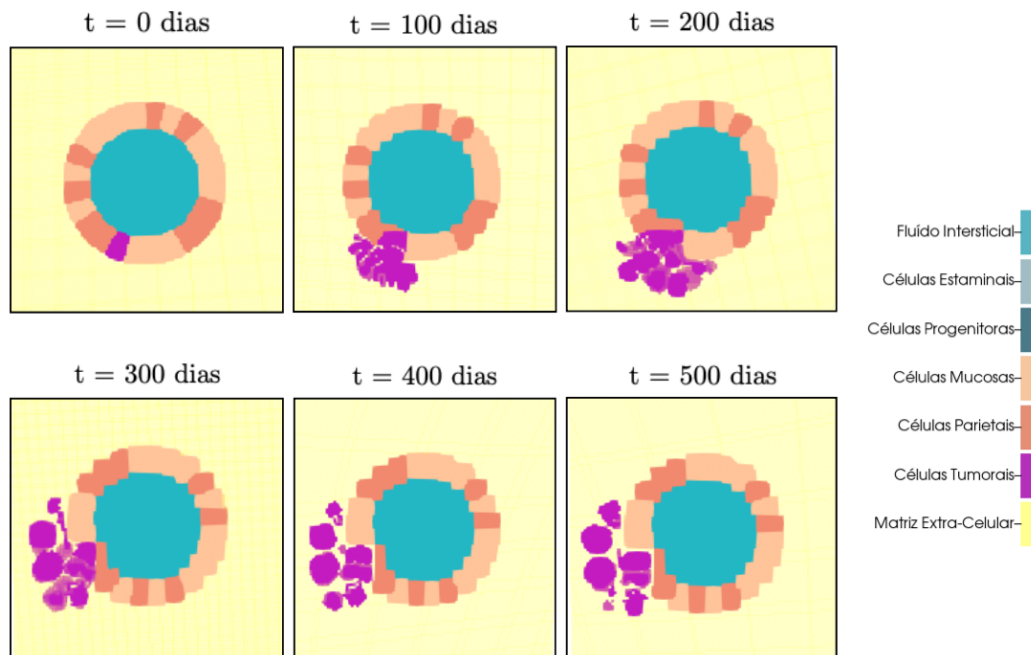


Figura 4.30: Cortes transversais de uma invaginação na região superior do pescoço ao longo da simulação.

Tendo em conta a Figura 4.30, verifica-se que ao longo do tempo as células tumorais tornam-se, de uma forma geral, cada vez mais esféricas, sendo que no início da simulação a sua forma é muito variada. Esta constatação vai de encontro aos resultados mostrados no gráfico da Figura 4.29. Como se pode comprovar pelo corte transversal no fim da simulação (500 dias), algumas das células não são circulares, o que afeta a média do seu momento de inércia, fazendo com que  $R_{MI}$  nunca atinja o valor de 1, apesar de a maioria das células apresentar uma forma aproximadamente circular. O mesmo se verifica nos cortes histológicos (Figura 4.27), já que nem todas as células em anel de sinete são exatamente circulares.

### 4.6.3 Influência do crescimento do tumor nas estruturas envolventes

Para simular o efeito do desenvolvimento tumoral nas estruturas envolventes, consideraram-se duas invaginações, representadas por dois cilindros, com uma célula tumoral a proliferar num dos cilindros em direção ao outro. Os resultados estão representados na Figura 4.31.

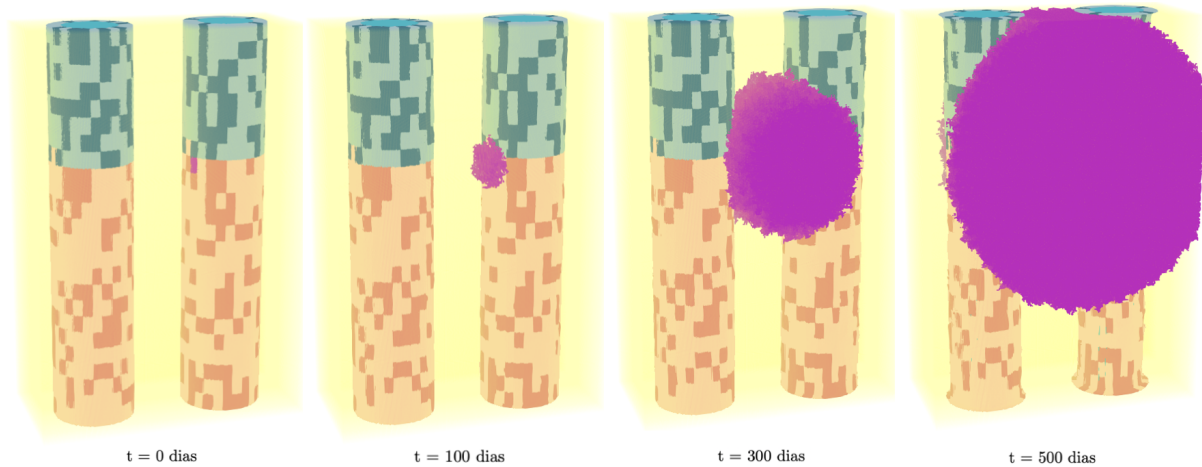


Figura 4.31: Representação de duas invaginações, uma com uma célula tumoral a proliferar em direção à outra.

Na Figura 4.31 observa-se que ao fim de 500 dias as dimensões do tumor são elevadas, atingindo a invaginação vizinha, alterando a conformação das células dos dois cilindros, pressionando-as e provocando uma diminuição do seu volume. Nos cortes transversais da Figura 4.32 é mais evidente a alteração na estrutura das duas invaginações, bem como o grande desenvolvimento do tumor ao longo do tempo. Então, o desenvolvimento tumoral afeta as estruturas vizinhas, principalmente as invaginações próximas que constituem o epitélio de revestimento do estômago.

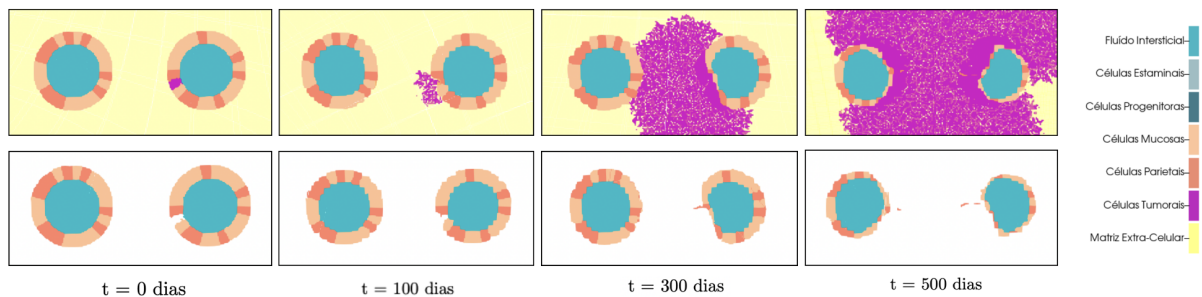


Figura 4.32: Cortes transversais do modelo considerando duas invaginações e uma célula tumoral com proliferação. Na primeira linha encontram-se representados os cortes transversais, considerando a proliferação tumoral e a matriz extra-celular; na segunda linha de cortes não é considerado o tumor nem a matriz extra-celular, para facilitar a visualização das estruturas das invaginações.

## Capítulo 5

# Conclusão

O principal objetivo do projeto descrito nesta dissertação consistia na criação de um modelo computacional que permitisse estudar o desenvolvimento do cancro gástrico difuso hereditário. Neste ponto do projeto é possível concluir que o objetivo principal foi alcançado, permitindo perceber como este tipo de patologia evolui, potenciando a aplicação de possíveis terapias.

Tendo em conta os resultados apresentados no Capítulo 4 é possível retirar várias conclusões importantes, tanto ao nível do modelo, como ao nível da patologia estudada. No que diz respeito ao modelo criado, pode concluir-se que vai de encontro ao esperado pois através dele é possível mimetizar estruturas típicas do epitélio que reveste as paredes internas do estômago, nomeadamente as invaginações e as respetivas células que as constituem, centrando o interesse apenas nas regiões implicadas no CGDH (istmo e pescoço). Desta forma conclui-se que o modelo é simples, mas realista e cumpre o seu principal objetivo – reproduzir as estruturas que intervêm no desenvolvimento do cancro gástrico difuso hereditário. Estas conclusões são corroboradas pelas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 (Secção 4.1), onde estão representadas as invaginações do estômago, bem como células que constituem duas das suas regiões, o istmo e o pescoço; são ainda representados cortes transversais que comprovam o realismo do modelo.

Relativamente ao desenvolvimento tumoral, este foi analisado inicialmente considerando apenas uma única célula tumoral, sem proliferação, podendo concluir-se que na presença desta o modelo manteve-se íntegro, sem alterações significativas na sua estrutura (Figura 4.4), o que também ficou comprovado pela avaliação da variação de volume das células que formam o modelo (Figura 4.8 e Figura 4.9).

Quando analisado isoladamente o desenvolvimento de uma única célula tumoral obtêm-se resultados que vão de encontro a outros estudos, primeiro usando o modelo matemático *phase-field* e depois, tendo em conta o obtido em análises histológicas. Assim, pode concluir-se que

o modelo criado é correto e realista, no que diz respeito à extrusão da célula (Figura 4.5) e às conclusões em relação à adesão entre a célula tumoral e a matriz extra-celular, já que esse aumento da adesão potencia a extrusão da célula para a matriz extra-celular (Figuras 4.9, 4.10 e 4.11), tal como já explicado na Secção 4.4.1.

Tendo em conta todos os estudos apresentados no capítulo anterior, é possível concluir que os valores considerados como condições iniciais dos parâmetros que descrevem o modelo matemático (Tabelas 4.2 e 4.3) são valores razoáveis, visto que permitem otimizar os resultados obtidos.

Em relação à proliferação tumoral, conclui-se que o crescimento do tumor afeta tanto a estrutura da invaginação onde este se desenvolve (Figuras 4.23 e 4.24) como as estruturas envolventes, nomeadamente as invaginações vizinhas (Figuras 4.29 e 4.30). O crescimento do tumor pressiona as restantes células, o que se traduz numa perda de volume das células normais e na alteração da sua forma para se adaptarem à proliferação do tumor e conseqüentemente à necessidade de espaço para crescer.

Outra conclusão importante relaciona-se com a forma das células tumorais que se verifica aproximadamente esférica, estando as células mais ou menos dispersas (Figura 4.28). Estes resultados são similares aos obtidos nos cortes histológicos (Figura 4.27) e permitem representar realisticamente as células emanel de sinete características do CGDH. Portanto, mais uma vez se comprova que o modelo desenvolvido é capaz de recriar o que na realidade acontece neste tipo de patologia.

Um dos objetivos do projeto inicial consistia na sugestão de novas terapias passíveis de serem aplicadas. Tendo em conta todos os resultados apresentados no Capítulo 4 e, principalmente, os estudos feitos para avaliar a influência da adesão entre as células, da sua rigidez e da duração do ciclo celular, é possível apresentar algumas terapias que possam ser aplicadas e que permitam obter melhores resultados de tratamento. O principal tratamento atual do CGDH consiste na realização de gastrectomias totais ou remoção do tumor para estádios precoces, podendo ou não estar associadas a sessões de quimioterapia no caso do estadió do cancro ser avançado e já existirem metastizações, o que afeta drasticamente a qualidade de vida dos doentes. Uma potencial terapia consiste em fazer diminuir a adesão da célula tumoral à matriz extra-celular, o que evita que o tumor se desenvolva fora da invaginação e que o seu volume diminua; é também possível aplicar uma terapia que consista no aumento da adesão entre a célula tumoral e as restantes, o que evita a extrusão celular (o seu volume não diminui); outra terapia poderia consistir em diminuir a rigidez da célula tumoral e, com isso, diminuir o volume da mesma; por último é ainda possível aumentar a duração do ciclo celular, o que faz com que as células



demorem mais tempo a desenvolverem-se, retardando o crescimento tumoral. De salientar que a perda de adesão entre as células é uma das características do CGDH, estando relacionada com mutações nos genes *CDH1* e *CTNAA1*, o que fomenta a perda de expressão da E-caderina e, por sua vez, a perda de adesão entre células, conduzindo à extrusão da célula tumoral. Daí que um mecanismo que promova a adesão celular e compense as mutações genéticas possa ser encarado como uma potencial terapia para este tipo de patologias. Quanto às restantes terapias mencionadas, é de realçar que nenhuma delas é totalmente eficaz a longo prazo na remoção completa das células tumorais, apenas evita que estas atinjam proporções elevadas. Por isso, estas terapias poderiam ser combinadas com sessões de quimioterapia ou radioquimioterapia aplicadas em alguns casos de CGDH como terapias coadjuvantes à cirurgia. Outra hipótese passaria, em deteções precoces, por combinar a remoção do tumor com alguma das potenciais terapias em detrimento da quimioterapia, o que permitiria evitar os seus efeitos secundários complexos e com isso melhorar a qualidade de vida dos doentes.

Em suma, conclui-se que todos os objetivos do projeto foram alcançados com sucesso, obtendo-se um modelo simples e realista que mimetiza com algum rigor o que ocorre durante o desenvolvimento do CGDH.

### 5.1 Trabalho futuro

Todos os modelos computacionais podem ser melhorados, tornando-os mais eficazes e especializados em determinados casos concretos que se pretendam estudar. No caso do modelo desenvolvido, este é simples e genérico, não se focando em questões biológicas específicas, porém é realista na simulação das estruturas e características típicas do CGDH.

Uma melhoria do modelo poderia consistir na adição de mais componentes biológicos, como por exemplo, considerar mais invaginações, o que permitiria estudar melhor qual a influência do desenvolvimento tumoral nas restantes estruturas vizinhas. Outro componente passível de ser considerado seria a adição da difusão de oxigénio e de nutrientes, o que permitiria encarar o desenvolvimento tumoral através de uma perspetiva biológica e não apenas mecânica. Assim poderia ser estudada qual a influência da presença de oxigénio e de nutrientes no crescimento do tumor, o que poderia, eventualmente, conduzir a uma potencial terapia mais eficiente. Por fim, outros pontos a melhorar poderiam ser a consideração da angiogénese do tumor, à semelhança do que outros modelos matemáticos estudam, permitindo retirar novas conclusões de como o tumor se desenvolve, e considerar a diferenciação celular que ocorre nas invaginações, nomeadamente no

que diz respeito às células estaminais. Todas estas melhorias tornariam o modelo mais complexo e realista, permitindo retirar novas conclusões tanto ao nível de como o tumor se desenvolve, mas também, testar potenciais terapias.

# Bibliografia

- [1] Luo, W., Fedda, F., Lynch, P., Tan, D. (2018). CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01421>.
- [2] Chen, Y. C., Fang, W. L., Wang, R. F., Liu, C. A., Yang, M. H., Lo, S. S., Wu, C. W., Li, A. F. Y., Shyr, Y. M., Huang, K. H. (2015). Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathology Oncology Research*, 22(1), 197–202. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9996-6>.
- [3] Instituto Nacional de Estatística. INE. Consultado a 16 de fevereiro de 2022 em <https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INExpgid=ineindicadoresindOcorrCod=0008281contexto=bdselTab=tab2xlang=pt>.
- [4] Cancer. (2019, julho 12). World Health Organization. Consultado a 30 de maio de 2022 em [https://www.who.int/health-topics/cancertab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancertab=tab_1).
- [5] Alarcón, T., Byrne, H., Maini, P. (2003). A cellular automaton model for tumour growth in inhomogeneous environment. *Journal of Theoretical Biology*, 225(2), 257–274. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(03\)00244-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(03)00244-3).
- [6] Alarcón, T., Byrne, H. M., Maini, P. K. (2005). A Multiple Scale Model for Tumor Growth. *Multiscale Modeling Simulation*, 3(2), 440–475. <https://doi.org/10.1137/040603760>.
- [7] Alarcón, T., Owen, M. R., Byrne, H. M., Maini, P. K. (2006). Multiscale Modelling of Tumour Growth and Therapy: The Influence of Vessel Normalisation on Chemotherapy. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 7(2–3), 85–119. <https://doi.org/10.1080/10273660600968994>.

- 
- [8] Owen, M. R., Alarcón, T., Maini, P. K., Byrne, H. M. (2009). Angiogenesis and vascular remodelling in normal and cancerous tissues. *Journal of Mathematical Biology*, 58(4–5), 689–721. <https://doi.org/10.1007/s00285-008-0213-z>.
- [9] Popławski, N. J., Agero, U., Gens, J. S., Swat, M., Glazier, J. A., Anderson, A. R. A. (2009). Front Instabilities and Invasiveness of Simulated Avascular Tumors. *Bulletin of Mathematical Biology*, 71(5), 1189–1227. <https://doi.org/10.1007/s11538-009-9399-5>.
- [10] Anderson, A. R. A. (2005). A hybrid mathematical model of solid tumour invasion: the importance of cell adhesion. *Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA*, 22(2), 163–186. <https://doi.org/10.1093/imammb/dqi005>.
- [11] Shirinifard, A., Gens, J. S., Zaitlen, B. L., Popławski, N. J., Swat, M., Glazier, J. A. (2009). 3D Multi-Cell Simulation of Tumor Growth and Angiogenesis. *PLoS ONE*, 4(10), e7190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007190>.
- [12] Jeanquartier, F., Jean-Quartier, C., Cemernek, D., Holzinger, A. (2016). In silico modeling for tumor growth visualization. *BMC Systems Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0318-8>.
- [13] Carvalho, J., Lopes, V., Travasso, R. (2020). Tumor cell invasiveness in the initial stages of bladder cancer development - A computational study. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 37(1). <https://doi.org/10.1002/cnm.3417>.
- [14] Carvalho, J., Lopes, V., Travasso, R. (2021). A three dimensional computer model of urothelium and bladder cancer initiation, progress and collective invasion. *Informatics in Medicine Unlocked*, 26, 100750. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100750>.
- [15] Li, Q., Qi, L., Feng, Q. X., Liu, C., Sun, S. W., Zhang, J., Yang, G., Ge, Y. Q., Zhang, Y. D., Liu, X. S. (2019). Machine Learning-Based Computational Models Derived from Large-Scale Radiographic-Radiomic Images Can Help to Predict Adverse Histopathological Status of Gastric Cancer. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3347895>.
- [16] Your Digestive System How it Works. (9 de dezembro de 2021). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Consultado a 16 de fevereiro de 2022 em <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/digestive-system-how-it-works>.

- [17] Anatomy and physiology of the stomach. Canadian Cancer Society. Consultado a 10 de fevereiro de 2022 em <https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/stomach/what-is-stomach-cancer/the-stomach>.
- [18] human digestive system - Esophagus. Encyclopedia Britannica. Consultado a 10 de fevereiro de 2022 em <https://www.britannica.com/science/human-digestive-system/Esophagus>.
- [19] Prosapio, J. G., Sankar, P., Jialal, I. (2022, January). Physiology, Gastrin. StatPearls. Consultado a 21 de março de 2022 em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534822/>.
- [20] human digestive system - Intestinal gas. Encyclopedia Britannica. Consultado a 21 de março de 2022, em <https://www.britannica.com/science/human-digestive-system/Intestinal-gasref294203>.
- [21] Prinz, C., Zanner, R., Gratzl, M. (2003). Physiology of Gastric Enterochromaffin-Like Cells. *Annual Review of Physiology*, 65(1), 371–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142205>.
- [22] Xiao, S., Zhou, L. (2020). Gastric Stem Cells: Physiological and Pathological Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.571536>.
- [23] Agnes, A., Estrella, J. S., Badgwell, B. (2017). The significance of a nineteenth century definition in the era of genomics: linitis plastica. *World Journal of Surgical Oncology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1187-3>.
- [24] Díaz Del Arco, C., Ortega Medina, L., Estrada Muñoz, L., Molina Roldán, E., Cerón Nieto, M. N., García Gómez De Las Heras, S., Fernández Aceñero, M. J. (2021). Are Borrmann's Types of Advanced Gastric Cancer Distinct Clinicopathological and Molecular Entities? A Western Study. *Cancers*, 13(12), 3081. <https://doi.org/10.3390/cancers13123081>.
- [25] MA, J., SHEN, H., KAPESA, L., ZENG, S. (2016). Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncology Letters*, 11(5), 2959–2964. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4337>.
- [26] Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press: Lyon 2000.
- [27] Russo, A. E., Strong, V. E. (2019). Gastric Cancer Etiology and Management in Asia and the West. *Annual Review of Medicine*, 70(1), 353–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-081117-043436>.

- [28] Weerakkody, Y. (2021, October 24). Gastric cancer (TNM staging). Radiology Reference Article — Radiopaedia.Org. Consultado a 16 de fevereiro de 2022 em <https://radiopaedia.org/articles/gastric-cancer-tnm-staging>.
- [29] National Comprehensive Cancer Network (NCCN). (2021). NCCN Guidelines for patients - Stomach cancer. Consultado a 4 de março de 2022 em <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/stomach-patient.pdf>.
- [30] Lobo, S., Benusiglio, P. R., Coulet, F., Boussemart, L., Golmard, L., Spier, I., Hüneburg, R., Aretz, S., Colas, C., Oliveira, C. (2021). Cancer predisposition and germline CTNNA1 variants. *European Journal of Medical Genetics*, 64(10), 104316. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104316>.
- [31] Pilonis, N. D., Tischkowitz, M., Fitzgerald, R. C., di Pietro, M. (2021). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Approaches to Screening, Surveillance, and Treatment. *Annual Review of Medicine*, 72(1), 263–280. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051019-103216>.
- [32] Melo, S., Figueiredo, J., Fernandes, M., Gonçalves, M., Morais-de-Sá, E., Sanches, J., Seruca, R. (2017). Predicting the Functional Impact of CDH1 Missense Mutations in Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2687. <https://doi.org/10.3390/ijms18122687>.
- [33] Pereira, P. S., Teixeira, A., Pinho, S., Ferreira, P., Fernandes, J., Oliveira, C., et al. (2006). E-cadherin missense mutations, associated with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome, display distinct invasive behaviors and genetic interactions with the Wnt and Notch pathways in *Drosophila epithelia*. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1704–1712. doi: 10.1093/hmg/ddl093.
- [34] Park, J. W., Jang, S. H., Park, D. M., Lim, N. J., Deng, C., Kim, D. Y., et al. (2014). Cooperativity of E-cadherin and Smad4 loss to promote diffuse-type gastric adenocarcinoma and metastasis. *Mol. Cancer Res.* 12, 1088–1099. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0192-T.
- [35] Park, J. W., Kim, M. S., Voon, D. C., Kim, S. J., Bae, J., Mun, D. G., et al. (2018). Multiomics analysis identifies pathways and genes involved in diffuse-type gastric carcinogenesis induced by E-cadherin, p53, and Smad4 loss in mice. *Mol. Carcinog.* 57, 947–954. doi: 10.1002/mc.22803.

- [36] Hu, B., el Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., Meloni-Ehring, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021>.
- [37] Humar, B., Fukuzawa, R., Blair, V., Dunbier, A., More, H., Charlton, A., Yang, H. K., Kim, W. H., Reeve, A. E., Martin, I., Guilford, P. (2007). Destabilized Adhesion in the Gastric Proliferative Zone and c-Src Kinase Activation Mark the Development of Early Diffuse Gastric Cancer. *Cancer Research*, 67(6), 2480–2489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3021>.
- [38] Waldum, H. L., Ringnes, E., Nordbø, H., Sørdal, Ø., Nordrum, I. S., and Hauso, Ø. (2014). The normal neuroendocrine cells of the upper gastrointestinal tract lack E-cadherin. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 974–978. doi: 10.3109/00365521.2014.909275.
- [39] El Rami, F. E., Barsoumian, H. B., Khneizer, G. W. (2020). Hereditary diffuse gastric cancer therapeutic roadmap: current and novel approaches in a nutshell. *Therapeutic advances in medical oncology*, 12. <https://doi.org/10.1177/1758835920967238>.
- [40] Boas, S. E. M., Jiang, Y., Merks, R. M. H., Prokopiou, S. A., Rens, E. G. (2018). Cellular Potts Model: Applications to Vasculogenesis and Angiogenesis. *Emergence, Complexity and Computation*, 279–310. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-65558-118>.
- [41] Guisoni, N., Mazzitello, K. I., Diambra, L. (2018). Modeling Active Cell Movement With the Potts Model. *Frontiers in Physics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphy.2018.00061>.
- [42] Chen, Ruoxi (Michelle). 2020. Incorporating Mechanics Into the Cellular Potts Model. Bachelor’s thesis, Harvard College.
- [43] Ramos, J. (2016). Mechanically-driven pattern formation in cell cultures. Master thesis in Physics. Physics Department at University of Coimbra – Coimbra. 98 pp.
- [44] Ramos, J. R. D., Travasso, R., Carvalho, J. (2018). Capillary network formation from dispersed endothelial cells: Influence of cell traction, cell adhesion, and extracellular matrix rigidity. *Physical Review E*, 97(1). <https://doi.org/10.1103/physreve.97.012408>.
- [45] Cellular Automata - 3D von Neumann neighbourhood. Cell-Auto. Consultado a 2 de abril de 2022 em <https://cell-auto.com/neighbourhood/3dvn/index.html>.

- [46] I. quimiotaxia - Infopédia. Infopédia - Porto Editora. Consultado a 5 de março de 2022 em [https://www.infopedia.pt/apoio/artigos/\\$quimiotaxia](https://www.infopedia.pt/apoio/artigos/$quimiotaxia).
- [47] Espina, J. A., Marchant, C. L., Barriga, E. H. (2021). Durotaxis: the mechanical control of directed cell migration. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.15862>.
- [48] Hassan G., A. A., Mohammad, K., Alireza, C. (2013). Spatio-Temporal Forest Fire Spread Modeling Using Cellular Automata. *Honey Bee Foraging and GIS.Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 3(1), 201–214.
- [49] Cellular Automata - 3D Moore neighbourhood. *Cell-Auto*. Consultado a 2 de abril de 2022 em <https://cell-auto.com/neighbourhood/3dmoore/index.html>.
- [50] Soda, T., Gen, Y., Terasaki, K., Iwai, N., Kitaichi, T., Dohi, O., Taketani, H., Seko, Y., Umemura, A., Nishikawa, T., Yamaguchi, K., Moriguchi, M., Konishi, H., Naito, Y., Itoh, Y., Yasui, K. (2022). Loss of KAP3 decreases intercellular adhesion and impairs intracellular transport of laminin in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08904-8>.
- [51] Carneiro, F., Figueiredo, J., Carvalho, J., Bordin, J.R., Dias, M.B., Soares, M.M., Guerrero, P., Seruca, R., Travasso, R., Melo, S. (2021). Stroma Invasion Driven by Loss of E-Cadherin Function - a mathematical modeling perspective on diffuse gastric cancer. (por publicar).